

DER LUMINESZENZIMMUNOLOGISCHE NACHWEIS VON
STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B IM VERGLEICH
ZUM ENZYMIMMUNOLOGISCHEN

MARTIN LOHNEIS

*Less
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0021

AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND TECHNOLOGIE
DER LEBENSMITTEL TIERISCHEN URSPRUNGS
(LEHRSTUHL: PROF. DR. G. TERPLAN)
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DER LUMINESZENZIMMUNOLOGISCHE NACHWEIS VON
STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN B IM VERGLEICH
ZUM ENZYMIMMUNOLOGISCHEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VON
MARTIN LOHNEIS
AUS
BAMBERG

MÜNCHEN 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. P.-A. Bachmann

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	EINLEITUNG 1
2	SCHRIFTTUM 2
2.1	Markierte Reaktionspartner in serologischen Nachweisverfahren 2
2.2	Allgemeines zur Lumineszenz 3
2.2.1	Definitionen 3
2.2.2	Mechanismen der Biolumineszenz 5
2.2.3	Mechanismen der Chemilumineszenz 8
2.3	Konjugate in lumineszenzimmunologischen Verfahren 12
2.3.1	Konjugate zur bioluminometrischen Bestimmung 12
2.3.2	Konjugate zur chemiluminometrischen Bestimmung 14
2.3.2.1	Enzymkopplung 14
2.3.2.2	Kopplung luminogener Substanzen 15
2.4	Lumineszenzimmunologische Nachweisverfahren 21
2.4.1	Homogene Verfahren 21
2.4.2	Heterogene Verfahren 22
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN 27
3.1	Immunisierungsversuche mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) 27
3.1.1	Material 27
3.1.2	Methodik 28
3.1.2.1	Toxinbestimmung 28
3.1.2.2	Immunisierung 28
3.1.2.3	Bestimmung präzipitierender Antikörper 29
3.1.2.4	Bestimmung der Antikörper mittels der indirekten ELISA-Technik 29
3.1.3	Ergebnisse 30

	Seite	
3.2	Isolierung von Schaf IgG und Kaninchen IgG	34
3.2.1	Material	34
3.2.2	Methodik	34
3.2.2.1	Proteinbestimmung	34
3.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.2.2.3	Isolierung von anti-SEB-Schaf IgG	35
3.2.2.4	Isolierung von Kaninchen IgG	36
3.2.3	Ergebnisse	37
3.3	Enzymmarkierung von anti-SEB-Schaf IgG und Kaninchen IgG	42
3.3.1	Material und Methodik	42
3.3.2	Ergebnisse	44
3.4	Nachweis von SEB im enzymimmunologischen Verfahren (Sandwich-ELISA)	44
3.4.1	Material	44
3.4.2	Herstellung des Immunosorbens	47
3.4.2.1	Methodik	47
3.4.2.2	Ergebnisse	48
3.4.3	Interferenzen durch Protein A im Sandwichverfahren	51
3.4.3.1	Methodik	51
3.4.3.2	Ergebnisse	52
3.4.4	Optimierung der Enzymbestimmung	54
3.4.4.1	Methodik	54
3.4.4.2	Ergebnisse	54
3.4.5	Standardisierung	54
3.4.5.1	Methodik	54
3.4.5.2	Ergebnisse	56
3.5	Nachweis von SEB im lumineszenzimmunologischen Verfahren (LIA)	56
3.5.1	Material	58
3.5.2	Methodik	59
3.5.2.1	Herstellung von Konjugaten für den LIA	59
3.5.2.2	Ergebnisse	62

	Seite
3.5.3 Erstellung eines LIA zum Nachweis von SEB	65
3.5.3.1 Methodik	65
3.5.3.2 Ergebnisse	66
3.6 Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von SEB mittels LIA und ELISA in Lebensmitteln	66
3.6.1 Material	66
3.6.2 Methodik	68
3.6.2.1 Herstellung von Lebensmittelextrakten	68
3.6.2.2 Der Nachweis von SEB in Lebensmittelextrakten mittels LIA und Sandwich-ELISA	69
3.6.3 Ergebnisse	70
4 DISKUSSION	72
5 ZUSAMMENFASSUNG	81
SUMMARY	83
6 LITERATUR	84

1. EINLEITUNG

Die Staphylokokken-Enterotoxin-Lebensmittelvergiftung wird durch von Staphylokokken gebildete hitzestabile Polypeptide verursacht. Da diese Toxine schon in sehr geringer Menge die Intoxikation hervorrufen können, sind entsprechend empfindliche Methoden für die Aufklärung von Erkrankungsfällen notwendig. Geeignete Verfahren müssen den Nachweis von $0,1 \mu\text{g}$ Toxin in 100 g Lebensmittel gewährleisten. Der klassische serologische Nachweis mittels Gelpräzipitationstechnik setzt zur Erfüllung dieser Forderung langwierige Extraktions-, Reinigungs- und Konzentrierungsschritte voraus, die oft hohe Toxinverluste bedingen, so daß ursprünglich vorhandene geringe Toxinkonzentrationen nicht mehr nachweisbar sind, abgesehen davon, daß der Zeitaufwand des gesamten Verfahrens mehrere Tage beträgt. Um den Enterotoxinnachweis zu vereinfachen und zu verkürzen, was auch eine vereinfachte Aufarbeitung des Untersuchungsgutes voraussetzt, ohne die zur Aufklärung von Lebensmittelvergiftungen geforderte Nachweisgrenze zu unterschreiten, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene enzymimmunologische Verfahren (ELISA) für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln entwickelt. Es konnten sehr ermutigende Ergebnisse erreicht werden, wenn auch bisher ein allgemeines anwendbares, befriedigendes Verfahren nicht zur Verfügung steht. Dies liegt im wesentlichen daran, daß einige Toxintypen noch nicht ausreichend gereinigt werden konnten und dementsprechend nicht für alle Serotypen spezifische Antikörper erhältlich sind. Hinzu kommt, daß die enzymimmunologischen Methoden trotz der relativ raschen Handhabung aufgrund der verschiedenen Wasch- und Inkubationsschritte arbeitsaufwendig sind und auch die Markerenzyme eine gewisse Labilität aufweisen.

Bei den bisher wenig bekannten lumineszenzimmunologischen Methoden ist dieser Nachteil nur in geringem Umfang bzw. überhaupt nicht zu erwarten. Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher bei Beachtung von Protein A-Interferenzen untersucht werden, ob dieses Verfahren eine gegenüber dem ELISA aus vor allem wirtschaftlichen Gründen wünschenswerte einfachere und schnellere Toxinbestimmung ermöglicht.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Markierte Reaktionspartner in serologischen

Nachweisverfahren

Um die hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion in serologischen Verfahren besser nutzen zu können, wurden Antikörper, Antigene oder Haptene an verschiedene Substanzen (Marker) gekoppelt (Konjugate), die eine sehr empfindliche Detektion der immunologischen Reaktion ermöglichen.

Bereits 1959 entwickelten YALOW und BERSON ein radioimmunologisches Verfahren, in dem sie sich die Markierung eines der serologischen Reaktionspartner mit Radioisotopen zunutze machten. Diese Methode, die vor allem im endokrinologischen Bereich breite Anwendung fand, ist allerdings mit den Nachteilen der geringen Halbwertszeiten der Isotope und der hohen Sicherheitsvorkehrungen im Labor behaftet (SCHUURS und VAN WEEMEN, 1977).

Enzymimmunologische (VAN WEEMEN und SCHUURS, 1971), fluoreszenzimmunologische (ULLMANN et al., 1976) und lumineszenzimmunologische (SCHROEDER et al., 1976a) Nachweisverfahren wurden daher als Alternativen zur radioimmunologischen Methode entwickelt.

Nach EKINS (1980) könnten in naher Zukunft einfache und zuverlässige chemilumineszenzimmunologische (SIMPSON et al., 1979; WEEKS et al., 1983b; WOOD et al., 1984) und zeitaufgelöste fluoreszenzimmunologische (SOINI und HEMMILÄ, 1979; PETTERSON et al., 1983) Nachweisverfahren die radiologischen ersetzen.

Die immunologischen Nachweismethoden mit markierten Reaktionspartnern lassen sich in homogene und heterogene, letztere nochmals in kompetitive und nicht kompetitive Verfah-

ren einteilen. Im Gegensatz zu den heterogenen Verfahren entfällt im homogenen Nachweis eine Trennung gebundener von ungebundenen Konjugaten. Kompetitive Verfahren beruhen auf der Konkurrenz markierter mit nicht markierten Konjugaten um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen. In nicht kompetitiven Verfahren hingegen, die nur für Antigene mit mehreren Determinanten geeignet sind, bildet sich zunächst ein insolubler Antigen-Antikörperkomplex, der dann mit markierten Antikörpern nachgewiesen wird (SCHUURS und VAN WEEMEN, 1977).

Der Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln konnte sowohl mit radioimmunologischen Verfahren (MILLER et al., 1978) als auch mit enzymimmunologischen Verfahren geführt werden. Eine Übersicht enzymimmunologischer Staphylokokken-Enterotoxinnachweise ist einer früheren Dissertation dieses Instituts (LINZ, 1983) zu entnehmen.

2.2 Allgemeines zur Lumineszenz

2.2.1 Definitionen

Die Lichtemission einer exergonischen chemischen Reaktion wird Chemilumineszenz genannt.

Chemilumineszenz in lebenden Organismen bezeichnet man als Biolumineszenz (SEITZ und NEARY, 1974; GORUS und SCHRAM, 1979).

Zur Erzeugung von Chemilumineszenz sind folgende Voraussetzungen notwendig:

- Hohe Energiefreisetzung durch exergonische chemische Reaktionen zur Erzielung elektronisch angeregter Molekülzustände

- Bevorzugte Bildung elektronisch angeregter Zustände im Reaktionsablauf
- Die Fähigkeit des elektronisch angeregten Moleküls zur Emission eines Photons oder zum Energietransfer an ein fluoreszierendes Molekül (SEITZ und NEARY, 1974; GORUS und SCHRAM, 1979; WHITEHEAD et al., 1979; MC ELROY und DE LUCA, 1983).

Eine wichtige Größe der Chemilumineszenz ist deren Quantenausbeute Φ_{CL} .

$$\Phi_{CL} = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl reagierender Moleküle}}$$

$$\Phi_{CL} = \Phi_E \cdot \Phi_{FL}$$

$$\Phi_E = \frac{\text{Anzahl elektronisch angeregter Zustände}}{\text{Anzahl reagierender Moleküle}}$$

$$\Phi_{FL} = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl elektronisch angeregter Zustände}}$$

(SEITZ und NEARY, 1974; ROSWELL und WHITE, 1978; WHITEHEAD et al., 1979).

Da bei vielen chemilumineszierenden Reaktionen das elektronisch angeregte Molekül in einem strahlungslosen Prozeß Energie an das Lösungsmittel abgibt bzw. an ein nicht fluoreszierendes Akzeptormolekül transferiert (GORUS und SCHRAM, 1979; MC ELROY und DE LUCA, 1983), liegt die Quantenausbeute der Chemilumineszenz meist nicht über 0,01 (ISACSSON und WETTERMARK, 1974; ROSWELL und WHITE, 1978; WHITEHEAD et al., 1979).

Die elektronisch angeregten Zustände der Biolumineszenz hingegen sind oft durch die Bindung an ein Protein (MC ELROY

und DE LUCA, 1983) und durch die starke Hydrophobie aktiver Stellen (DE LUCA et al., 1964; GORUS und SCHRAM, 1979) vor Energieverlusten geschützt. Dies erklärt die hohe Quantenausbeute (0,1 - 0,9) der Biolumineszenz (WHITEHEAD et al., 1979; MC ELROY und DE LUCA, 1983).

2.2.2 Mechanismen der Biolumineszenz

Neben vielen terrestrischen Lebewesen mit Lumineszenzphänomenen (DE LUCA, 1978; DE LUCA und MC ELROY, 1981) ist die weitaus größte Anzahl lumineszierender Organismen ozeanischer Herkunft (MC CAPRA, 1976). Eingehendere Untersuchungen zu Mechanismen der Biolumineszenz beschränken sich jedoch auf wenige bekannte Systeme (MC CAPRA, 1973).

Im folgenden Abschnitt sollen biolumineszierende Systeme, die in immunologischen Verfahren Anwendung fanden, näher dargestellt werden.

Die Biolumineszenz des Leuchtkäfers Photinus pyralis

Luciferin und das Enzym Luciferase, zwei wesentliche Komponenten der Lumineszenz von *Photinus pyralis* sind schon seit langem bekannt (GREEN und MC ELROY, 1956; BITLER und MC ELROY, 1957).

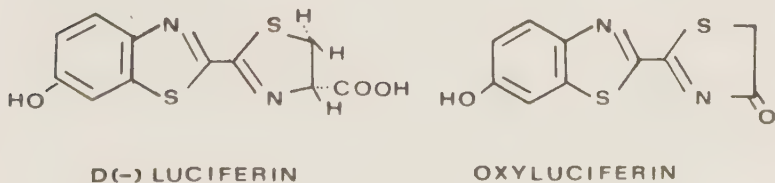


Abbildung 1: Struktur von D(-)Luciferin und Oxyluciferin

WHITE et al. konnten 1961 die Molekülstruktur des Luciferins aufklären und wenig später aktives D(-)Luciferin (Abb. 1) synthetisieren (WHITE et al., 1963).

Luciferase wurde hingegen durch Präzipitation mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus Leuchtkäferlaternenextrakten gewonnen (STREHLER et al., 1957; DE LUCA und MC ELROY, 1978). Das gereinigte dimere Enzym besitzt eine katalytische Untereinheit im Molekulargewichtsbereich von 50 000 (DE LUCA et al., 1964; WHITE-HEAD et al., 1979).

Luciferase katalysiert die folgenden Reaktionen:



Die Carboxylgruppe des Luciferins (LH_2) bildet zunächst mit Adenylsäure von ATP ein Anhydrid, wobei Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt wird. Im limitierenden Schritt der Reaktionsfolge spaltet das Enzym im Enzym-Luciferyladenylat-Komplex ($\text{E}\cdot\text{LH}_2\text{-AMP}$) ein Proton ab und ändert seine Konformation, wodurch nun molekularer Sauerstoff gebunden werden kann. Unter Decarboxylierung des Luciferins entsteht dann ein Enzym-Oxyluciferyl-Komplex im elektronisch angeregten Zustand ($\text{E}\cdot\text{P}^*$). Der Komplex emittiert ein Lichtquant, erleidet einen elektronischen Übergang zum Grundzustand und dissoziiert sehr langsam in Luciferase und Oxyluciferin (Abb. 1) (DE LUCA und MARSCH, 1967; SELIGER und MORTON, 1968); WHITE et al., 1975; KOO et al., 1978; MC ELROY und DE LUCA, 1981; MC ELROY und DE LUCA, 1983).

Die Biolumineszenz mariner Bakterien

Bakterielle Luciferase wurde vorwiegend aus den Bakterienstämmen *Vibrio harveyi* und *Vibrio fischeri* isoliert (GUNSALUS-MIGUEL et al., 1972; MC ELROY und DE LUCA, 1983). Das aktive Zentrum des heterodimeren ($\alpha\beta$) Enzyms ist nach MEIGHEN et al. (1971a), MEIGHEN et al. (1971b) und CLINE und HASTINGS (1972) auf der α -Untereinheit (Molekulargewichtsbereich 42 000) lokalisiert, während nach FRIEDLAND und HASTINGS (1972) auch die β -Untereinheit (Molekulargewichtsbereich 37 000) zur Enzymaktivität beiträgt.

Bakterielle Luciferase katalysiert die folgende Reaktion:



Das Pyridinnukleotid FMNH_2 wird in einer mischfunktionellen Oxidation zusammen mit einem längerkettigen aliphatischen Aldehyd über ein Peroxyflavin-Zwischenprodukt von Luciferase oxidiert (HASTINGS und NEALSON, 1977; NEALSON und HASTINGS, 1979; MC ELROY und DE LUCA, 1983). Substituiertes Flavin kann Licht bei 495 nm emittieren (HASTINGS et al., 1981).

Mit NADH oder NADPH reduzieren spezifische NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktasen FMN zu FMNH_2 (MC ELROY und DE LUCA, 1983), wobei FMNH_2 einer sehr schnellen Autoxidation unterliegt (JABLONSKI und DE LUCA, 1979).

Die Biolumineszenz der Meeresmuschel *Pholas dactylus*

Pholas Luciferin, ein Glykoprotein (Molekulargewichtsbereich 34 600) besitzt eine prosthetische Gruppe, die zur Lichtemission oxidiert wird (HENRY et al., 1970; HENRY et al., 1973; MICHELSON et al., 1978).

Pholas Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin mit Sauerstoff, wobei Licht bei 490 nm emittiert wird (MICHELSON, 1978). Diese Katalyse kann auch von Meerrettichperoxidase, die hier als Oxidase wirkt, übernommen werden. Dadurch wurde ein sehr empfindlicher Nachweis des Enzyms als Marker in immunologischen Verfahren ermöglicht (HENRY et al., 1973; PUGET et al., 1977).

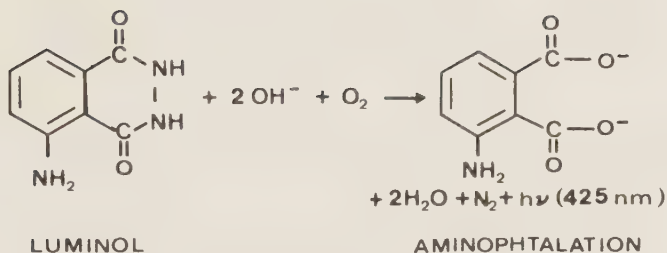
2.2.3 Mechanismen der Chemilumineszenz

Überraschend viele chemische Reaktionen sind lumineszierend (WHITE und ROSWELL, 1970; GUNDERMANN, 1974). Hier sollen jedoch nur für immunologische Verfahren bedeutsame Mechanismen der Chemilumineszenz dargestellt werden.

Zyklische Diacylhydrazide

Neben Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazindion)- und Isoluminol (6-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazindion)-Konjugaten wurden in lumineszenzimmunologischen Verfahren vor allem Kopplungsprodukte mit Isoluminolderivaten verwendet (siehe 2.3.2.2).

Am Beispiel von Luminol wird in der folgenden Gleichung die lumineszierende Reaktion der zyklischen Diacylhydrazide aufgezeigt:



Die Oxidation von Luminol führt zur Bildung eines elektronisch angeregten Aminophtalations, das Licht bei 425 nm emittiert (SEITZ und NEARY, 1974; ROSWELL und WHITE, 1978; GORUS und SCHRAM, 1979; WHITEHEAD et al., 1979). Wie allerdings in der Reaktion ein elektronisch angeregter Zustand erzeugt werden kann, ist noch nicht endgültig geklärt. Angenommen wurden Elektronentransfermechanismen (RAPAPORTE et al., 1972), Mechanismen, bei denen Azoquinone wirken (ROSWELL und WHITE, 1978) und ein chemisch ausgelöster Elektronenaustausch (KOO und SCHUSTER, 1978).

Zur obigen Oxidation sind in protischen Lösungsmitteln ein Oxidationsmittel und die Gegenwart eines Katalysators notwendig (SEITZ und NEARY, 1974; ROSWELL und WHITE, 1978). Verschiedene Oxidationssysteme, wie Ferricyanid-H₂O₂ (NAKAMURA, 1972; AUSES et al., 1975; BOSTICK und HERCULES, 1975), Kupferacetat-H₂O₂ (PRATT et al., 1978), Hämin (chelatgebundenes Eisen) bzw. Lactoperoxidase in Verbindung mit den Oxidationsmitteln H₂O₂ und NaBO₃ (NEUFELD et al., 1965; EWETZ und THORE, 1976; SCHROEDER et al., 1976b) kamen zur Anwendung. In der durch Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidation von Luminol kommt es zur Bildung von Luminol-

radikalen, die wiederum als Substrat für eine lichterzeugende Reaktion fungieren (CORMIER und PRICHARD, 1968; PRICHARD und CORMIER, 1968). Durch Zusatz von D(-)Luciferin (Abb. 1) konnte die Lichtemission bei einem pH-Wert von 8,0 mehrfach verstärkt werden (WHITEHEAD et al., 1983).

In lumineszenzimmunologischen Verfahren wurde jedoch meist mit dem Microperoxidase- H_2O_2 -Oxidationssystem gearbeitet.

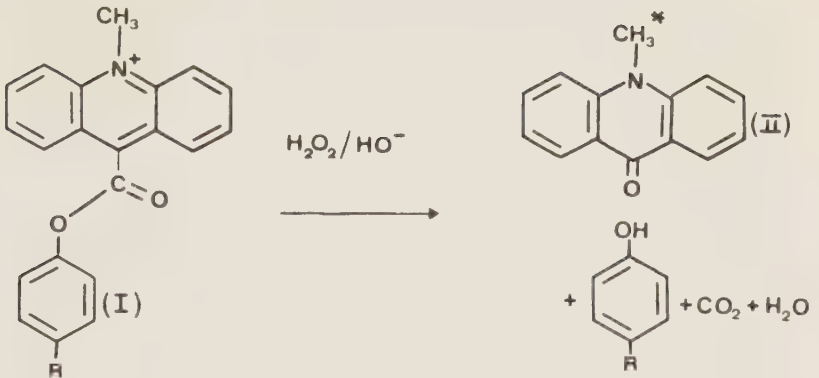
Neben den Oxidationsbedingungen ist die Quantenausbeute der lumineszierenden Reaktion stark von der Struktur der Diacylhydrazide abhängig. So steigert eine Alkylierung von Isoluminol die Lichtemission erheblich, während eine ähnliche Substitution von Luminol den chemilumineszierenden Reaktionsmechanismus sterisch hindert (GUNDERMANN und DRAWERT, 1962; BRUNDRETT et al., 1972; BRUNDRETT und WHITE, 1974; SCHROEDER und YEAGER, 1978).

Pyrogallol und Purpurogallin

Peroxidasen katalysieren die chemilumineszierende Reaktion von Pyrogallol mit H_2O_2 (AHNSTRÖM und NILSSON, 1965), wobei eine Dimerbildung aus Pyrogallolradikalen den Reaktionsablauf limitiert (NILSSON, 1964). Der Abbau des dimeren Produktes erfolgt unter Lichtemission mit H_2O_2 (NILSSON, 1964).

BÖHM und ZSCHÖCK (1984) setzen hingegen Purpurogallin als luminogene Substanz zum Nachweis von Meerrettichperoxidase ein.

Acridiniumester

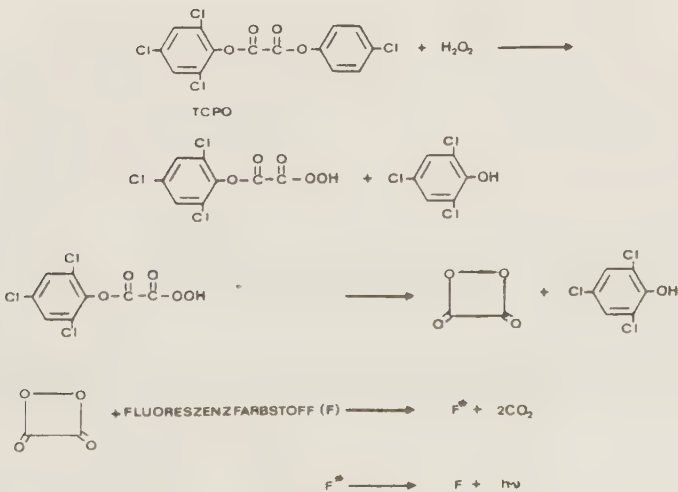


I : Acridiniumester

II : N- Methylacridon

Im alkalischen Milieu bilden Acridiniumester (Acridinium-phenyloxalcarboxylate) mit H_2O_2 elektronisch angeregte N-Methylacridone, die Licht emittieren (WEEKS et al., 1983a).

Chemilumineszenz und Energietransfer



Der Oxalester Bis(trichlorphenyl)oxalat (TCPO) wird mit H_2O_2 zu einem Peroxyoxalatzwischenprodukt oxidiert. Zur Lichtemission transferiert das Zwischenprodukt seine Energie an ein fluoreszierendes Molekül (RAUHUT et al., 1967; WILLIAMS et al., 1976; ARAKAWA et al., 1982).

PATEL und CAMPBELL (1983) und PATEL und Mitarbeiter (1983) beschrieben einen intermolekularen Chemilumineszenzenergie transfer innerhalb eines Antigen-Antikörperkomplexes. Das oxidierte zyklische Diacylhydrazid Aminobutylethylisoluminol gibt dabei seine Energie an ein fluoreszierendes Akzeptormolekül (Fluorescein) ab.

SHAPIRO und Mitarbeiter (1984) konnten die Chemilumineszenz von Fluoresceinisothiocyanat nach Oxidation mit $Ca(OCl)_2$ durch Kopplung an den Antikörper um das 1 000-fache verstärken. Die Autoren vermuten den Wirkungsmechanismus in einem Energietransfer vom oxidierten Protein an das Fluorescein.

2.3 Konjugate im lumineszenzimmunologischen Verfahren

2.3.1 Konjugate zur bioluminometrischen Bestimmung

Zur luminometrischen Bestimmung spezifischer Proteinbindungsreaktionen wurden zunächst Kofaktoren der Biolumineszenz an Liganden gekoppelt. So synthetisierten zunächst CARRICO et al. (1976) aktive Konjugate verschiedener Adenosintriphosphatderivate mit 2,4-Dinitrophenol. Die kovalente Kupplung von Biotin und 2,4-Dinitrofluorbenzol an die freie Aminogruppe eines Nicotinamidadenindinucleotidderivates führten SCHROEDER et al. (1976a) durch. Zur quantitativen Bestimmung wurden die enzymatisch aktiven Kopplungsprodukte mit alkoholischer Dehydrogenase und Ethanol zu $NADH_2$ reduziert.

WANNLUND und DE LUCA (1981) sowie WANNLUND und DE LUCA (1982) koppelten hingegen ohne größere Verluste der katalytischen Aktivität Leuchtkäfer Luciferase an Methotrexat, Dinitrophenol und Trinitrotoluen.

Pyruvatkinase, ein Adenosintriphosphat (ATP) erzeugendes Enzym, diente REICHARD und MILLER (1981), WOOD et al. (1982) und GADOW et al. (1984) zur Herstellung eines Enzym-Immunglobulin G-Konjugates für das immunologische Verfahren. Die Reaktion der Hydroxysuccinimidestergruppen heterobifunktionaler Reagenzien (Hydroxysuccinimidestergruppe und Maleimidgruppe) mit Immunglobulinen ermöglicht zunächst eine Aktivierung des Antikörpers, der sich dann an die Sulfhydrylgruppen im Enzym kuppelt (KITAGAWA und AIKAWA, 1976; O'SULLIVAN et al., 1978). Da die freien Sulfhydrylgruppen der Pyruvatkinase nicht im aktiven Zentrum lokalisiert sind, kommt es im Gegensatz zu anderen ATP-produzierenden Enzymen (Acetatkinase und Adenylatkinase) nur zu einer geringen Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit des gekoppelten Enzyms (GADOW et al., 1984). Zudem kann der Antikörper wegen des Fehlens von Sulfhydrylgruppen im IgG-Molekül während der Kopplung nicht polymerisieren (O'SULLIVAN et al., 1979). REICHARD und MILLER (1981) und WOOD et al. (1982) synthetisierten Konjugate mit dem Reagens m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimid, während von GADOW et al. (1984) optimale Kopplungsprodukte mit den Reagenzien Succinimidyl-4-(N-maleimidophenyl)-cyclohexan-1-carboxylat und Succinimidyl-6-(p-maleimidophenyl)-hexanoat hergestellt wurden.

FRICKE et al. (1982) bedienten sich der gleichen Kupplungsmethode zur Herstellung eines Pyruvatkinase-Transferrin-Konjugates.

Bakterielle Luciferase koppelten PUGET et al. (1977) an Antikörper und WANNLUND und DE LUCA (1981) an Dinitrophenol.

Dinitrophenol- und Trinitrotoluen-Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Konjugate ermöglichten ein empfindliches Nachweissystem der bakteriellen Biolumineszenz. Das Enzym katalysiert hierbei die Oxidation von Glucose in Gegenwart des Coenzyms NAD, dessen reduzierte Form bioluminometrisch gemessen werden kann (WANNLUND und DE LUCA, 1982).

Pholas dactylus Luciferin diente PUGET et al. (1977) ebenfalls zum empfindlichen Nachweis Peroxidase-markierter Antikörper.

2.3.2 Konjugate zur chemiluminometrischen Bestimmung

2.3.2.1 Enzymkopplung

Mittels gemischter Anhydridmethode kuppelten ARKAWA et al. (1979) Meerrettichperoxidase an Cortisol- und ARKAWA et al. (1981) an Dehydroepiandrosteronderivate. Zur Herstellung von Meerrettichperoxidase-IgG-Konjugaten diente AIZAWA et al. (1980) die Glutaraldehydkopplungsmethode und MILLER und REICHARD (1981) die Perjodatkopplungsmethode. Der Nachweis der obigen Hapten- bzw. IgG-Kopplungsprodukte erfolgte im immunologischen Verfahren durch Oxidation von Luminol mit H_2O_2 als Oxidationsmittel.

Die Bestimmung Peroxidase-markierter Konjugate konnten WHITEHEAD et al. (1983) erheblich verbessern, indem sie durch Zusatz von Leuchtkäfer D(-)Luciferin (Abb. 1) eine mehrfache Verstärkung der bei pH 8,0 katalysierten Lumineszenzreaktion von Luminol mit H_2O_2 erzielten.

OLSSON et al. (1979) bestimmten im alkalischen Bereich mit Luminol und $NaBO_3$ die mittels Zweischritt-Glutaraldehydmethode nach AVRAMEAS und TERNYNCK (1971) an IgG gekuppel-

te Meerrettichperoxidase.

Peroxidase-IgG und Peroxidase-Staphylokokken-Enterotoxin B-Konjugate konnten im Lumineszenztest mit Pyrogallol und H_2O_2 bei pH 6,5 nachgewiesen werden (VELAN et al., 1977; VELAN und HALMANN, 1978).

Zur Bestimmung Protein A-gebundener Peroxidase erschien hingegen BÖHM und ZSCHÖCK (1984) das luminogene Substrat Purpurogallin am geeignetsten.

Ähnlich der Peroxidase katalysiert auch Hämin die Oxidation von Luminol mit H_2O_2 . Diese Möglichkeit wurde zum Nachweis von Humanserumalbumin-Hämin- und IgG-Hämin-Konjugaten genutzt (IKARIYAMA et al., 1982; IKARIYAMA et al., 1983).

Auch Glucoseoxidase-Kopplungsprodukte, die die Bildung von H_2O_2 katalysieren, dienten zum Nachweis des gebildeten Peroxids mit einer Oxidation von Luminol. Die Oxidationsreaktion wurde von Meerrettichperoxidase (PUGET et al., 1977) bzw. Ferricyanid (BOTTI et al., 1981) katalysiert. ARAKAWA et al. (1982) ermittelten hingegen das gebildete H_2O_2 mit einem Oxalester (Bis(2,4,6-trichlorphenyl)oxalat), der nach einer Oxidation seine Energie an einen fluoreszierenden Farbstoff (8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure) transferiert.

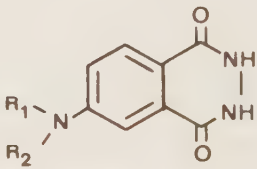
2.3.2.2 Kopplung luminogener Substanzen

In zwei Schritten koppelten PRATT et al. (1978) ein Luminolderivat und Testosteron-7 α -carboxyethylthioether mittels EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin) an Eialbumin. Das resultierende Luminol-Testosteron-Konjugat zeigte allerdings bereits nach kurzer Lagerzeit vermin-

derte Bindungskapazität für den spezifischen Antikörper.

Zur Herstellung weiterer Konjugate dienten verschiedene Isoluminolderivate, deren chemische Struktur in Tab. 1 dargestellt ist. Zwei Alkylgruppen im Molekül ermöglichten dabei eine höhere Quantenausbeute als Derivate mit einer alkylierten Gruppe (SCHROEDER et al., 1978; PAZZAGLI et al., 1983).

Tabelle 1: Struktur von Isoluminol und Isoluminolderivaten

		
R_1	R_2	
H-	H-	Isoluminol
$NH_2(CH_2)_2-$	H-	Aminoethylisoluminol (AEI)
$NH_2(CH_2)_2-$	CH_3CH_2-	Aminoethylethylisoluminol (AEEI)
$NH_2(CH_2)_4-$	H-	Aminobutylisoluminol (ABI)
$NH_2(CH_2)_4-$	CH_3-	Aminobutylmethylisoluminol (ABMI)
$NH_2(CH_2)_4-$	CH_3H_2-	Aminobutylethylisoluminol (ABEI)
$NH_2(CH_2)_5-$	CH_3CH_2-	Aminopentylethylisoluminol (APEI)
$NH_2(CH_2)_6-$	CH_3CH_2-	Aminohexylethylisoluminol (AHEI)
$NH_2CH_2(OH)CHCH_2-$	H-	Aminohydroxypropylisoluminol (AHPI)
$NH_2CH_2(HO)CHCH_2-$	CH_3CH_2-	Aminohydroxypropylethylisoluminol (AHPEI)
$COOH-CH_2-\overset{H}{\text{CON}}-(CH_2)_4-$	CH_3-CH_2-	Aminobutylethylisoluminol-hemisuccinamid (ABEI-H)

SCHROEDER et al. (1976b), SCHROEDER et al. (1978) und SCHROEDER und YEAGER (1978) synthetisierten AHPI-Biotin-Konjugate, ohne die luminogenen Eigenschaften des Labels erheblich zu beeinflussen.

Die Kopplung von AHEI (SCHROEDER und YEAGER, 1978), AHPEI (SCHROEDER et al., 1978; SCHROEDER und YEAGER, 1978) und ABEI (SCHROEDER et al., 1977; SCHROEDER et al., 1978; SCHROEDER und YEAGER, 1978; SCHROEDER et al., 1979; WEERA-SEKERA et al., 1983) an Thyroxin führte hingegen zu einer starken Verminderung der Lichtemission. Gleiche Beobachtungen machten SCHROEDER et al. (1978) und SCHROEDER und YEAGER (1978) mit einem Thyroxin-Naphthylhydrazid-Konjugat. Die Autoren führten die Beeinträchtigung der Lichtemission auf die relativ großen Jodatome im Thyroxin, die als Fluoreszenzlöscher bekannt sind (RADDA, 1975; FLEMING et al., 1977), zurück.

Mittels gemischter Anhydridmethode kuppelten PATEL und CAMPBELL (1983) und PATEL et al. (1983) Succinyl-Zyklo-AMP und Succinyl-Zyklo-GMP an ABEI.

Breite Anwendung fand eine Zwei-Schritt-Methode zur kovalenten Bindung luminogener Moleküle an Steroide (Tab. 2 und 3). Über ihre reaktiven Gruppen (Hemisuccinat, Carboxymethyloxim, Glucuronid) wurden hierbei die Steroide durch Inkubation mit N-Hydroxysuccinimid und Carbodiimid an die Aminogruppe eines Isoluminolderivates gebunden (PAZZAGLI et al., 1983).

Mit der gleichen Methode kuppelten BARNARD et al. (1984) und BROCKELBANK et al. (1984) ABEI-H an humanes Choriongonadotropin. Allerdings aktivierten sie das luminogene Molekül, das sich dann an die Aminogruppen des Hormons binden konnte.

Tabelle 2: Kopplung von Steroidhemisuccinaten an
Isoluminolderivate

Isoluminolderivat	Autoren
AEI	PAZZAGLI et al. (1981d); PAZZAGLI et al. (1983)
AEEI	PAZZAGLI et al. (1981d); PAZZAGLI et al. (1983)
ABI	PAZZAGLI et al. (1981a); PAZZAGLI et al. (1981d); PAZZAGLI et al. (1983)
ABMI	PAZZAGLI et al. (1983)
ABEI	PAZZAGLI et al. (1981a); PAZZAGLI et al. (1981d); PATEL und CAMPBELL (1983); MESSERI et al. (1984)
APEI	KOHEN et al. (1980b)
AHEI	KOHEN et al. (1979); PAZZAGLI et al. (1981d); PAZZAGLI et al. (1983)

Tabelle 3: Kopplung von Steroiden über reaktive Gruppen an Isoluminolderivate

reaktive Gruppe	Isoluminol-derivat	Autoren
Carboxy-methyl-oxim	AEEI	PAZZAGLI et al. (1983)
	ABI	PAZZAGLI et al. (1983)
	ABEI	KIM et al. (1982); DE BOEVER et al. (1983); KOHEN et al. (1983); PAZZAGLI et al. (1983)
	APEI	PAZZAGLI et al. (1981c)
Glucuronid	AEEI	WEERASEKERA et al. (1982); KOHEN et al. (1983)
	ABEI	KOHEN et al. (1980a); KOHEN et al. (1981); WEERASEKERA et al. (1982); PAZZAGLI et al. (1983); VANNUCCHI et al. (1983)
	AHEI	BARNARD et al. (1981); ESHHAR et al. (1981); KOHEN et al. (1983)

HERSH et al. (1979) konnten ein mit Perjodat oxidiertes Immunglobulin G unter Bildung Schiffscher Basen kovalent an Luminol binden.

SIMPSON et al. (1979), SIMPSON et al. (1981), CHENG et al. (1982), GADOW et al. (1984) und JONES und KUMAR (1984) kuppelten hingegen Diazoluminol an Tyrosylgruppen im IgG. Ähnliche Kopplungsversuche führten CHENG et al. (1982) und GADOW et al. (1984) mit Diazoisoluminol durch. Da die reak-

tive Gruppe des Diazoisoluminols sterisch nicht gehindert ist und das Molekül sich auch nicht intern stabilisieren kann, erfolgte zwar eine schnelle Kopplungsreaktion, die resultierenden Konjugate waren jedoch wegen ihrer geringen Lichtemission nicht für das immunologische Verfahren geeignet (GADOW et al., 1984).

Kovalente Bindungen eines Succinatderivates von Luminol mit Carbodiimid und mit der gemischten Anhydridmethode an Immunglobulin blieben wegen der geringen Kopplungsrate unbefriedigend (SIMPSON et al., 1981).

Ebenfalls mit der Carbodiimidmethode kuppelten CHENG et al. (1982) ABEI an Immunglobulin. Um mildere Reaktionsbedingungen zu erreichen, führten dagegen PATEL et al. (1982), PATEL und CAMPBELL (1983) und PATEL et al. (1983) vor der Kopplung eine Isothiocyanatgruppe zur Bindung an die Aminogruppe im Protein in das ABEI-Molekül ein.

SCHROEDER et al. (1981a) und SCHROEDER et al. (1981b) aktivierten zunächst das Isoluminolderivat Carboxymethoxyacetylhexylethylisoluminol, um es dann an die Aminogruppen der Antikörper kovalent zu binden. Mit der gleichen Zweischritt-Methode kuppelten BARNARD et al. (1984) und GADOW et al. (1984) ABEI-H an Immunglobulin.

Trotz gleicher Nachweisgrenze für Diazoluminol und ABEI-H zeigten Vergleiche entsprechender IgG-Konjugate im immunologischen Verfahren eine weit höhere Lichtemission der ABEI-H-Konjugate (GADOW et al., 1984). Die Autoren führten die unterschiedliche Qualität der Konjugate auf den Kopplungsmechanismus zurück. Während nämlich die oxidative Reaktion der Diazoverbindung die Antikörperstruktur zerstören kann, reagiert das aktivierte ABEI-H unter milden, nicht oxidativen Bedingungen analog der BOLTON-HUNTER-Jodierung

von Proteinen (BOLTON und HUNTER, 1973) mit den Aminogruppen des Immunglobulins.

Weiterhin wurden Acridiniumester mittels Carbodiimid (SIMPSON et al., 1981) bzw. mit einer N-Succinimidylestergruppe (WEEKS et al., 1983a) kovalent an IgG gekuppelt.

Ein Fluoresceinisothiocyanat-IgG-Konjugat für das chemilumineszenzimmunologische Verfahren stellten SHAPIRO et al. (1984) her.

2.4 Lumineszenzimmunologische Nachweisverfahren

2.4.1 Homogene Verfahren

Mit Haptenen gekuppelte Kofaktoren der Biolumineszenz sind nach Bindung an einen spezifischen Antikörper inaktiv. Dies machte die Durchführung homogener kompetitiver immunologischer Verfahren, in denen eine Trennung antikörpergebundener Konjugate von ungebundenen Konjugaten entfällt, möglich (CARRICO et al., 1976; SCHROEDER et al., 1976a).

Eine Verstärkung der Lumineszenz von Hapten-Isoluminol-derivat-Kopplungsprodukten nach der Bindung an einem Antikörper bildet dagegen die Basis für homogene Verfahren, in denen die Lichtemission mit steigenden Konzentrationen an freien Haptenen abnimmt (SCHROEDER et al., 1976b; SCHROEDER et al., 1978; KOHEN et al., 1979; KOHEN et al., 1980a; KOHEN et al., 1980b; KOHEN et al., 1981; PAZZAGLI et al., 1981c; MESSERI et al., 1984).

Ein empfindliches chemilumineszierendes homogenes Verfahren entwickelten PATEL und CAMPBELL (1983) und PATEL et al. (1983). Durch die Bindung ABEI-markierter Antigene bzw.

Haptene an einen Fluorescein-markierten Antikörper wird hierbei ein strahlungsloser Energietransfer ermöglicht, der wiederum das Verhältnis der Chemilumineszenz bei 406 nm/525 nm verändert.

2.4.2 Heterogene Verfahren

Zur Trennung der Reaktionspartner fand im heterogenen luminometrischen Verfahren zunächst die Präzipitation der Immunkomplexe mit überschüssigem zweiten Antikörper Anwendung (PRATT et al., 1978; HERSH et al., 1979). Ein weiteres, vom radioimmunologischen Verfahren bekanntes Trennprinzip beim Steroidnachweis (ABRAHAM, 1974) beruht auf der Adsorption ungebundener Steroide an Dextran-beschichtete Kohlepartikel (PAZZAGLI et al., 1981b; PAZZAGLI et al., 1981e; KLINGLER und VON POSTEL, 1982). Die Abtrennung der Präzipitate bzw. der Kohlepartikel machte einen Zentrifugierschritt notwendig.

Zur physikalischen Trennung im heterogenen Verfahren wurden jedoch meist Festkörperphasen (Immunsorbentien) eingesetzt. Eine Gelfiltration von Serumproben an Sephadex G-25 diente SCHROEDER et al. (1977) und SCHROEDER et al. (1979) zur gleichzeitigen Extraktion und Adsorption von Thyroxin. Adsorbiertes Thyroxin und Thyroxinkonjugat konkurrierten dann während einer Inkubationszeit um zugesetzte spezifische Antikörper. Nach der Elution der Antigen-Antikörper-Komplexe konnte die Probe schließlich luminometrisch bestimmt werden.

Weitere Immunsorbentien waren mit Antikörper beladene, kleine uniforme Plastikpartikel (KLINGLER et al., 1982) sowie kovalent an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B (AXEN et al., 1967), an Polyacrylamidkügelchen (DE BOEVER

et al., 1983) bzw. an Cellulose (FRICKE et al., 1982; WEEKS et al., 1983b) gebundene Immunoproteine. Diese Festkörperphasen wurden durch Zentrifugieren von den löslichen Reaktionspartnern getrennt. Zur kovalenten Bindung von Antikörpern an mikrokristalline Cellulose wurden zwei Verfahren entwickelt. HALES und WOODHEAD (1980), KEMP et al. (1981), WEEKS et al. (1983a) und WEEKS et al. (1983b) diazotierten Aminocellulose zu Diazocellulose, die sich an das Protein binden konnte. FRICKE et al. (1982) und WOOD et al. (1982) oxidierten mit Natriumperjodat die Hydroxylgruppen der Cellulose. Oxydierte Cellulose reagiert dann mit Aminogruppen im Protein unter Bildung Schiffscher Basen, die durch Reduktion stabilisiert wurden.

Weiterhin wurden im lumineszenzimmunologischen Verfahren Proteine durch unspezifische physikalische Bindungskräfte (CATT und TREGGAR, 1967) an Plastikmaterialien (Röhrchen, Kugeln, Microtiterplatten) adsorbiert. Die unspezifische Adsorption ist vor allem auf hydrophobe Interaktionen zwischen den nicht polaren Proteinstrukturen und dem ebenfalls nicht polaren Plastikmaterial zurückzuführen (ENGVAL, 1980; HERMANN, 1980).

Zur kovalenten Bindung von Antigenen bzw. Antikörpern an eine Polyvinylchloridplatte führten AIZAWA et al. (1980), IKARIYAMA et al. (1982) und IKARIYAMA et al. (1983) zunächst Aminogruppen in das Polymer ein und aktivierten dann die Platte mit Glutaraldehyd. An den aktivierten Festkörper konnten sich nun die Proteine binden.

Ebenfalls eine kovalente Bindung von Antikörpern und Protein-Hapten-Konjugaten an Polystyrenkugeln beschrieben WOOD und GADOW (1983) und WOOD et al. (1984). Nach unspezifischer Adsorption des Copolymers Phenylalanin-Lysin erfolgte auch hier eine Aktivierung der Kugeln mit Glutar-

aldehyd und die kovalente Bindung der Immunoproteine an die aktivierte Kugel:

Die Verwendung der oben beschriebenen Festkörperphasen (adsorptive und kovalente Bindung von Proteinen an Plastikmaterialien) im lumineszenzimmunologischen Verfahren macht zur Entfernung ungebundener Reaktionspartner einen oder mehrere Waschschrirte notwendig.

Eine Unterteilung heterogener lumineszenzimmunologischer Methoden in kompetitive und nicht kompetitive Verfahren ist in den Tab. 4 - 6 vorgenommen worden.

Tabelle 4: Kompetitive lumineszenzimmunologische Verfahren mit einem Zentrifugierschritt

Festkörper	Autoren
kleine uniforme Plastikpartikel	KLINGLER et al. (1982); KLINGLER und VON POSTEL (1982); WEERASEKERA et al. (1983)
Sepharose 4B	VELAN und HALMANN (1978); ARAKAWA et al. (1979); ARAKAWA et al. (1981); WANNLUND und DE LUCA (1982)
Polyacrylamid-kügelchen	DE BOEVER et al. (1983); KOHEN et al. (1983); BARNARD et al. (1984)
Cellulose	FRICKE et al. (1982); WOOD et al. (1982)

Tabelle 5: Kompetitive lumineszenzimmunologische Verfahren
mit Waschschritten

Protein- bindung	Festkörper	Autoren
adsorptiv	Röhrchen	ARAKAWA et al. (1981); BARNARD et al. (1981); ESHHAR et al. (1981); KIM et al. (1982); LINDSTRÖM et al. (1982); STRASBURGER et al. (1982); WEERASEKERA et al. (1982); VANNUCCHI et al. (1983); WEERASEKERA et al. (1983); BROCKELBANK et al. (1984)
	Kugeln	STRASBURGER et al. (1982)
kovalent	Kugeln	WOOD und GADOW (1983); WOOD et al. (1984)
	Platten	AIZAWA et al. (1980); IKARIYAMA et al. (1982)

Tabelle 6: Nicht kompetitive lumineszenzimmunologische Verfahren

Arbeits-schritt	Protein-bindung	Festkörper	Autoren
waschen	adsorptiv	Röhrchen	SIMPSON et al. (1979); OLSSON et al. (1979); SIMPSON et al. (1981); CHENG et al. (1982); BARNARD et al. (1984); SHAPIRO et al. (1984)
		Microtiter-platten	BOTTI et al. (1981); SCHROEDER et al. (1981a); SCHROEDER et al. (1981b)
		Kugeln	KONISHI et al. (1980); PRONOVOST et al. (1981); ARAKAWA et al. (1982); CHENG et al. (1982); PRONOVOST et al. (1982); WHITEHEAD et al. (1983); JONES und KUMAR (1984)
zentrifugieren	kovalent	PVC-Platte	AIZAWA et al. (1980); IKARIYAMA et al. (1983)
		Kugeln	WOOD et al. (1984)
		Polyacrylamidkugeln	CHENG et al. (1982)
		Cellulose	WEEKS et al. (1983a); WEEKS et al. (1983b)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Immunisierungsversuche mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

3.1.1 Material

SEB wurde nach Adsorption von α -Toxin an Erythrozytenmembranen entsalzt und Exoproteine mit einem $pI > 8,7$ mittels Chromatofokussierung mit Pharmalyten Typ 6,5 - 9, pH 7,7 (Pharmacia) abgetrennt (ENDE et al., 1983). Die Prüfung auf Reinheit, Spezifität und Homogenität erfolgte mittels Doppeldiffusionstechnik nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) bzw. in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach DAVIES und STARK (1970) in Gegenwart von 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS).

Deutsche Merinolandschafe wurden als Jährlinge in den Versuch genommen und während der Versuchsphase im Stall gehalten. Vor Immunisierungsbeginn erfolgte eine Blutentnahme und die Untersuchung der gewonnenen Nullsera auf das Vorhandensein präzipitierender Antikörper gegen die Staphylokokken-Enterotoxine A, B, C, D und E.

In der Doppeldiffusionstechnik wurden Referenztoxine und Antisera der Firma Serva verwendet.

Im indirekten enzymimmunologischen Verfahren wurden folgende Geräte, Reagenzien und Lösungen verwendet:

- Microtiterplatten (Dynatech)
- Multikanalpipette (Dynatech)
- 12-Kanalwaschgerät, Immunowash 12 (Nunc)
- Taumelgerät, Reax 3 (Heidolph) zur Bewegung der Platten während Absättigung, Antiserum- und Konjugatinkubation

- Microelisa Autoreader MR 580 (Dynatech)
- bovines Serumalbumin (BSA; Sigma A 7030)
- Tween 20 (Sigma)
- Konjugat: Peroxidase-markiertes anti-Schaf IgG (Cappel Laboratories Inc.)
- ortho-Phenylendiamin (OPD; Sigma P 3888)
- Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen: 0,05 mol phosphatgepufferte 0,15 mol NaCl-Lösung, pH 7,2 (PBS) mit einem Zusatz von 2 % BSA (2 % BSA-PBS)
- Inkubationspuffer für Antiserum und Konjugat: 2 % BSA-PBS mit 0,05 % Tween 20 (2 % BSA-PBS-Tween)
- Waschlösung: 0,15 mol NaCl mit 0,05 % Tween 20 (NaCl-Tween) zum fünfmaligen Waschen der Platten nach den einzelnen Testschritten
- Substratlösung: 0,05 mol Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0 mit 2,5 mmol OPD und 4 mmol H_2O_2 (kurz vor Gebrauch ansetzen).

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Toxinbestimmung

Toxinkonzentrationen konnten durch Extinktionsmessungen bei 277 nm bestimmt werden, wobei für SEB ein Extinktionskoeffizient von $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 14,4$ zugrunde gelegt wurde (BERG-DOLL, 1970).

3.1.2.2 Immunisierung

Zur Immunisierung von Schafen (Tier 1 - 3) orientierten wir uns zunächst an einem Immunisierungsschema von NOTERMANS (1982).

Zuerst wurden 10 µg SEB in 1 ml PBS mit 1 ml komplettem

Freundschen Adjuvans (Difco) emulgiert und den Schafen an drei bis vier Stellen intramuskulär appliziert. Im Abstand von jeweils zehn Tagen erfolgten dann analoge Applikationen mit 20, 40, 100 und 200 µg SEB. Das Toxin wurde mit 1 ml inkomplettem Freundschem Adjuvans im Verhältnis 1 : 1 emulgiert. Abweichend vom Schema nach NOTERMANS (1982) erfolgten Restimulierungen der Tiere sieben Wochen, bei Schaf 3 zusätzlich 13 und 18 Wochen nach der Grundimmunisierung mit 200 µg SEB in 1 ml inkomplettem Freundschen Adjuvans.

3.1.2.3 Bestimmung präzipitierender Antikörper

Im Verlauf der Immunisierung wurden die Tiere sieben Tage nach der dritten und 14 Tage nach der fünften Grundimmunisierung, vor und zehn Tage nach der ersten Restimulierung, sowie Schaf 3 vor und zehn Tage nach der zweiten und dritten Restimulierung geblutet.

Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde das Blut über Nacht bei 4° C belassen und dann zweimal abzentrifugiert (20 min bei 3000 U/min).

Gewonnene Sera konnten nach vorheriger Inaktivierung (30 min, 56° C) mittels der mod. Doppeldiffusionstechnik (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) analysiert werden, wobei die Referenztoxine in einer Konzentration von 1,25 µg/ml eingesetzt wurden.

3.1.2.4 Bestimmung der Antikörper mittels der indirekten ELISA-Technik

Um neben den präzipitierenden Antikörpern auch die Population der bindenden Immunglobuline (IgG) zu erfassen, erfolgte zusätzlich eine Analyse der anti-SEB-Sera mit der indirekten ELISA-Technik.

In Vorversuchen wurden zunächst die optimale SEB-Konzentration zur Beschichtung der Microtiterplatten sowie die geeignete Konjugatverdünnung ermittelt.

100 µl SEB pro Kavität (0,8 µg/ml) in PBS verblieben 3 h bei 37° C und anschließend über Nacht bei 4° C. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte eine einstündige Absättigung der Platten (250 µl 2 % BSA-PBS/Kavität).

Null-Sera und anti-SEB-Sera wurden in Dreifachansätzen, ausgehend von 1 : 100, in Verdünnungsstufen von 1 : 3 und einem Volumen von jeweils 100 µl 1 h bei Zimmertemperatur auf dem Taumelgerät inkubiert. Als Negativwert diente der Inkubationspuffer.

Nach einem Waschschrift wurden die Platten mit Konjugat (100 µl; 1 : 8000 in 2 % BSA-PBS-Tween verdünnt) 1 h bei Zimmertemperatur auf dem Taumelgerät inkubiert und dann erneut gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung wurde die Reaktion nach 15 min mit 1,25 mol H_2SO_4 (25 µl) gestoppt. Die Messung erfolgte mit dem Microelisa Autoreader bei 490 nm.

Der ELISA-Titer wurde, wie in Abb. 2 dargestellt, definiert als die Verdünnung, die nach der Substratinkubation einen Extinktionswert (490 nm) von 0,1 über den Nullwert ergab.

Der niedrigste Extinktionswert, der aus einer Reihenverdünnung resultierte, wurde als Nullwert bezeichnet.

3.1.3 Ergebnisse

Der Verlauf der Immunantwort während der Immunisierung ist in Tab. 7 (Präzipitationstiter) und Abb. 3 (ELISA-Titer) dokumentiert. Bereits nach der ersten Restimulierung zeigten die Tiere hohe spezifische anti-SEB-Präzipitationstiter (1 : 256 bis 1 : 512). Durch zusätzliche Restimulierungen von Schaf 3 konnte eine weitere Steigerung der Immunantwort erzielt werden (Präzipitationstiter 1 : 1024).

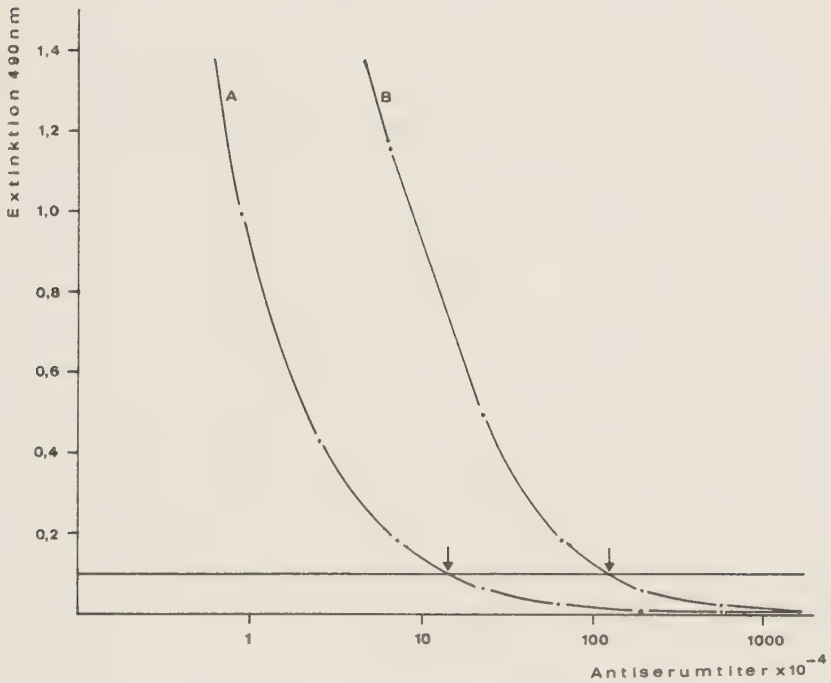


Abbildung 2: Beispiel für die Ermittlung der SEB-spezifischen ELISA-Titer in Sera

A: Schaf 3, nach 3. Grundimmunisierung

B: Schaf 3, nach 1. Restimulierung

Tabelle 7: Maxima reziproker Präzipitationstiter bei
mit SEB immunisierten Schafen

reziproke Präzipitationstiter			
	Schaf 1	Schaf 2	Schaf 3
a	-	4	1
b	32	256	256
c	128	256	256
d	256	512	512
e	/	/	256
f	/	/	512
g	/	/	1024
h	/	/	1024

a: nach dritter,

b: nach fünfter Grundimmunisierung;

c: vor,

d: nach erster Restimulierung;

e: vor,

f: nach zweiter Restimulierung;

g: vor,

h: nach dritter Restimulierung

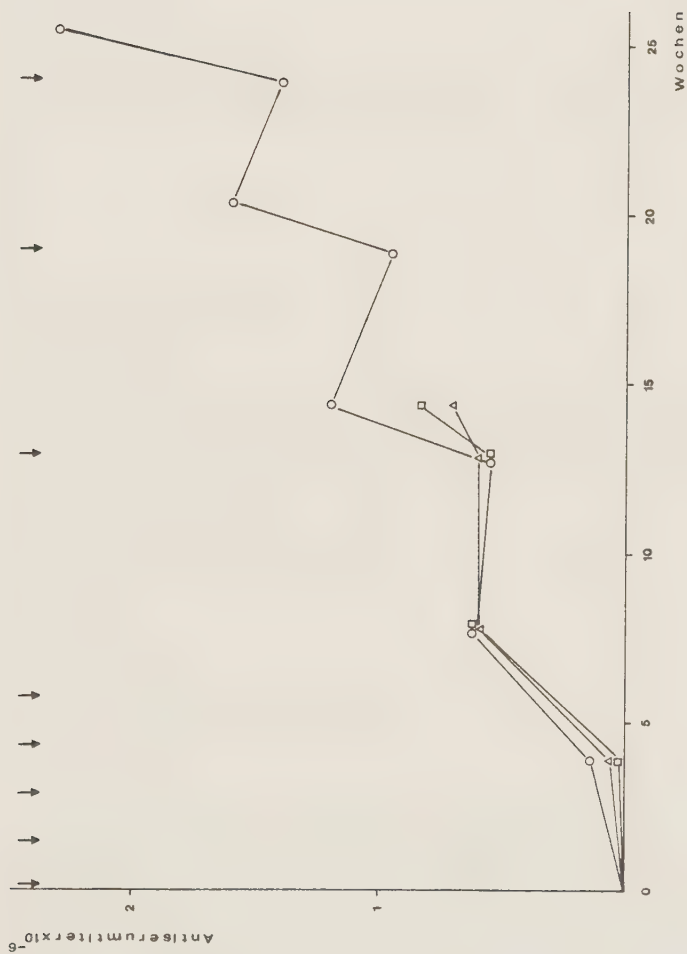


Abbildung 3: Immunantwort von Schafen nach Immunisierung mit SEB

Mit der indirekten ELISA-Technik, als zweitem Analysenverfahren, wurde ein im wesentlichen analoger Titeranstieg festgestellt.

3.2 Isolierung von Schaf IgG und Kaninchen IgG

3.2.1 Material

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- DEAE-Trisacryl M (LKB) zur Ionenaustauschchromatographie
- anti-Schaf-Serum (DAKO) und anti-Schaf IgG (Cappel Laboratories Inc.) bzw. anti-Kaninchen-Vollserum (Miles) und anti-Kaninchen IgG (Miles) zur Immunelektrophorese
- hochmolekularer Eichkit für Gelelektrophorese (Pharmacia)
- Peroxidase-konjugiertes anti-Schaf IgG (Cappel Laboratories Inc.) in der indirekten ELISA-Technik.

3.2.2 Methodik

3.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach LOWRY et al. (1951), wobei eine mit bovinem Serumalbumin (Serva) erstellte Eichkurve als Standard diente. Bei Vorliegen von Proteinlösungen in Tris-HCl-Puffer erwies es sich als notwendig, die Methode so zu modifizieren, daß zuerst Protein in 20 % Trichloressigsäure präzipitiert und vor der Messung in 0,2 mol NaOH gelöst wurde.

3.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Verfahren von DAVIES und STARK (1970) in Gegenwart von 1 % SDS durchgeführt. Die Behandlung der Referenzproteine mit Mercaptoethanol erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.3 Isolierung von anti-SEB-Schaf IgG

Schaf anti-SEB-Serum (Tier 3, zehn Tage nach der dritten Restimulierung) wurde zunächst durch Ammoniumsulfatfällung gereinigt. Hierzu wurde der Proteingehalt des Serums bestimmt und auf 3 bis 4 % eingestellt. Die Präzipitation erfolgte mit 2 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 min im Eisbad und anschließend über Nacht bei 4° C unter Rühren. Das Präzipitat wurde dann abzentrifugiert (20 min, 2500 U/min bei 4° C) und zweimal in 2 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suspendiert und zentrifugiert. Nach den Waschvorgängen wurde das Zentrifugat (Ig-Rohfraktion) gelöst und gegen Tris-HCl-Puffer (0,025 mol Tris-HCl, 0,035 mol NaCl, 0,02 % NaN_3 , pH 8,8) äquilibriert. Zur Isolierung von IgG aus der Rohfraktion folgte eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M mit einem stufenweisen Tris-HCl-Puffergradienten (Puffer I - III, siehe Tab. 8).

Hierzu wurden 18 ml einer 2,5 %igen Proteinlösung auf die Gelmatrix (Säule: 45 x 2,6 cm) aufgebracht und mit sechs Tropfen/min eluiert (70 Tropfen/Röhrchen).

Nach Vereinigung der erhaltenen Fraktionen wurde der Proteingehalt mittels Ultrafiltration auf 1 bis 2 % eingestellt. Die Analyse der immunologischen Spezifität einzelner Fraktionen erfolgte immunoelektrophoretisch mit der Methode nach GRABAR und WILLIAMS (1953).

Tabelle 8: Tris-HCl-Puffergradient zur Isolierung von anti-SEB-Schaf IgG mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M

Puffer	I	II	III	IV*
Tris-HCl	0,025 mol	0,025 mol	0,025 mol	0,1 mol
NaCl	0,035 mol	0,075 mol	0,15 mol	1 mol
NaN ₃	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %
pH-Wert	8,8	8,5	7,5	8,8

* Regenerationspuffer

Zur Prüfung der Homogenität IgG-haltiger Fraktionen diente die SDS-PAGE.

Die Antigen-spezifische Bindungskapazität konnte mit der indirekten ELISA-Technik (siehe 3.1.2.4) ermittelt werden.

3.2.2.4 Isolierung von Kaninchen IgG

Nach Vorreinigung eines unspezifischen Kaninchenvollserums durch Ammoniumsulfatfällung wurde IgG mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M (siehe 3.2.2.3) aus der Rohfraktion isoliert.

Hierzu wurden 12 ml einer 2,5 %igen Ig-Rohfraktion auf die Gelmatrix aufgetragen, erhaltene Fraktionen vereinigt und auf einen Proteingehalt von 1 bis 2 % ankonzentriert.

Es folgte eine immunoelektrophoretische Prüfung der Fraktionen mittels anti-Kaninchen-Vollserum und anti-Kaninchen IgG. Gereinigtes Kaninchen IgG wurde zusätzlich in der SDS-PAGE auf Homogenität geprüft.

3.2.3 Ergebnisse

Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M konnten aus der anti-SEB-Schaf Ig-Rohfraktion die fünf Fraktionen I, IIa, IIb, IIIa und IIIb isoliert werden (Abb. 4).

Abbildung 5 dokumentiert die immunoelektrophoretische Analyse der Fraktionen I - IIIb. Proteine der Fraktionen I, IIa und IIb zeigten ein für IgG₂ bzw. IgG₁ charakteristisches Wanderungsverhalten, wobei Fraktion IIb neben der Hauptkomponente IgG₁ eine geringgradige Kontamination (β -Globulin-Wanderungsverhalten) aufwies.

Die Fraktionen IIIa und IIIb enthielten Proteine, die mit α -, β - und γ -Globulinen wanderten, sowie Albumin.

In der SDS-PAGE (Abb. 8) zeigte sich ebenfalls, daß Fraktion IIb neben IgG ein höhermolekulares Protein enthielt, während sich die Fraktionen I und IIa homogen darstellten. Bei der Prüfung der Fraktion IIa auf Spezifität konnte im Enzymimmotest noch eine positive Reaktion bei einer Proteinkonzentration von 15 ng IgG/ml festgestellt werden. Für weitere Untersuchungen wurde IgG₁ der Fraktion IIa verwendet.

Die Kaninchen Ig-Rohfraktion wurde chromatographisch in sieben Fraktionen (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa und IIIb) aufgetrennt (Abb. 6).

Eine immunoelektrophoretische Analyse (Abb. 7) zeigte in den Fraktionen Ia, Ib, Ic und IIa Proteine, die aufgrund ihres Wanderungsverhaltens als IgG₂ bzw. IgG₁ zu charakterisieren waren. Fraktion IIb enthielt neben IgG₁ mehrere Kontaminanten, die mit den β -Globulinen wanderten. In den Fraktionen IIIa und IIIb konnten immunoelektrophoretisch neben IgG auch Proteine mit für α - und β -Globuline charakteristischem Wanderungsverhalten sowie Albumin identifiziert werden.

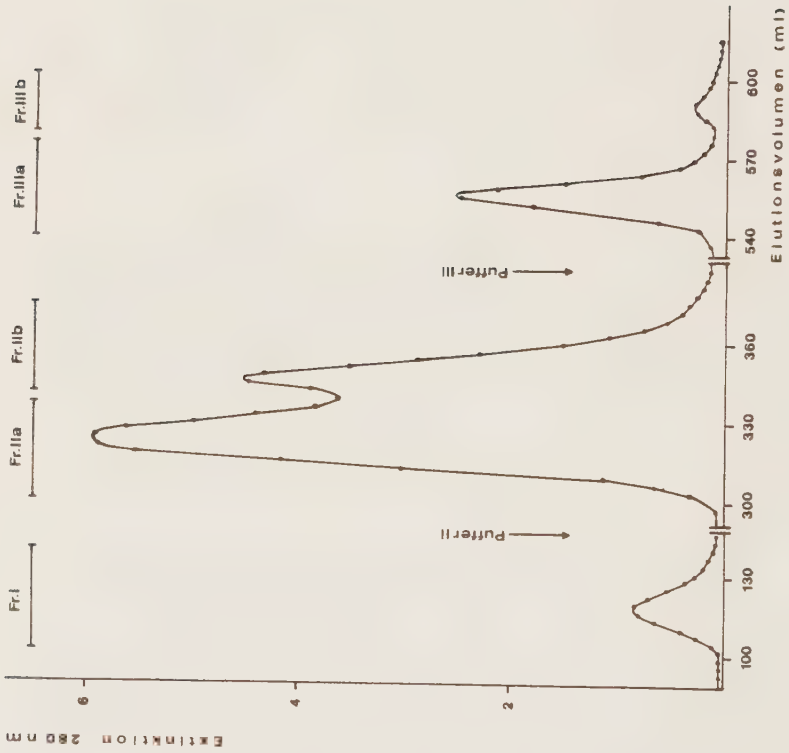


Abbildung 4: Ionenaustauschchromatographie einer anti-SEB Schaf Ig-Rohfraktion

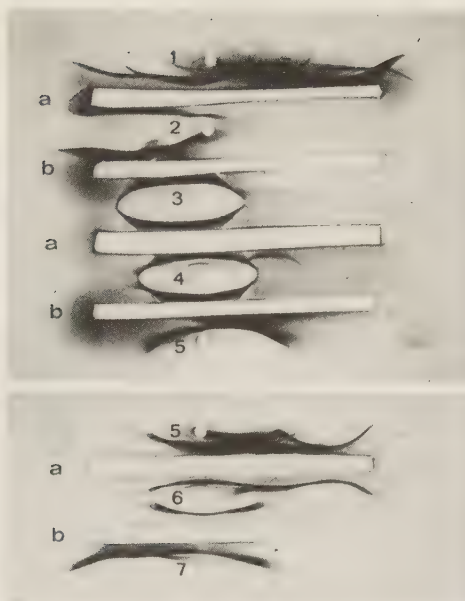


Abbildung 5: Immunelektrophoretische Analyse einer anti-SEB-Schaf Ig-Rohfraktion nach Ionenaustauschchromatographie an Trisacryl M

a: anti-Schaf-Serum,

b: anti-Schaf IgG,

1: anti-SEB-Schaf-Serum,

2: Fraktion I,

3: Fraktion IIa,

4: Fraktion IIb,

5: Fraktion IIIa,

6: Fraktion IIb

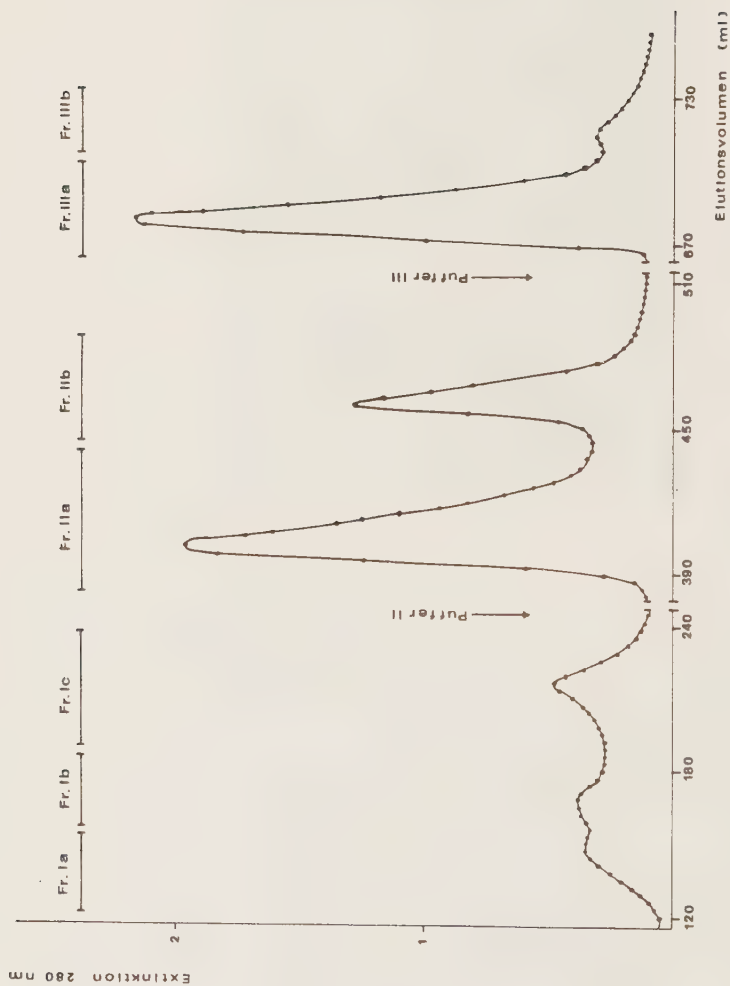


Abbildung 6: Ionenaustauschchromatographie einer Ig-Rohfraktion vom Kaninchen

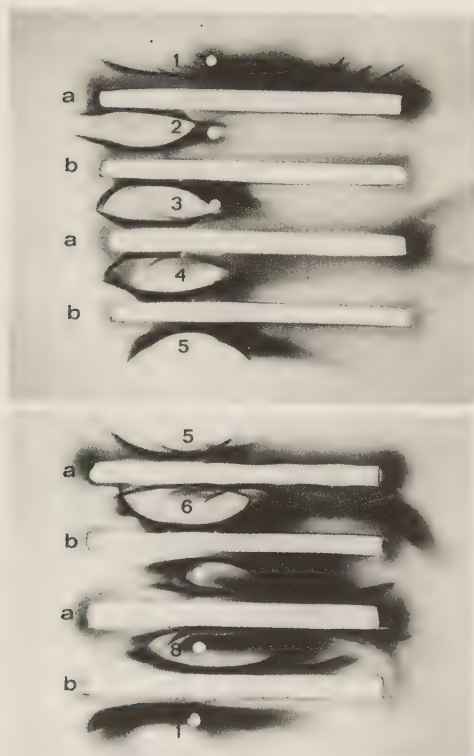


Abbildung 7: Immunelektrophoretische Analyse einer Kaninchen Ig-Rohfraktion nach Ionenaustauschchromatographie an Trisacryl M

a: anti-Kaninchen-Serum,

b: anti-Kaninchen IgG,

1: Kaninchenserum,

2: Fraktion Ia,

3: Fraktion Ib,

4: Fraktion Ic,

5: Fraktion IIa,

6: Fraktion IIb,

7: Fraktion IIIa,

8: Fraktion IIIb

IgG der vereinigten Fraktionen Ia, Ib, Ic und IIa erwies sich auch in der SDS-PAGE als homogen (Abb. 8) und wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt.

3.3 Enzymmarkierung von anti-SEB-Schaf IgG und Kaninchen IgG

3.3.1 Material und Methodik

Zur Kopplung von Meerrettichperoxidase (Typ VI, RZ: 3,2; Sigma) an gereinigtes Schaf IgG bzw. Kaninchen IgG fand die Methode nach WILSON und NAKANE (1978) Anwendung. Hierzu wurden 4 mg Peroxidase (POD) in 1 ml Aqua dest. gelöst, 0,2 ml frisch angesetztes 0,1 mol NaIO_4 zugegeben und 20 min bei Zimmertemperatur gerührt (Farbumschlag!). Die oxidativ entstandene POD-Aldehydlösung wurde anschließend über Nacht bei 4° C gegen 1 mmol Natriumacetatpuffer pH 4,4 dialysiert.

Durch Zusatz von 20 μl 0,2 mol Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 konnte der pH-Wert der Aldehydlösung auf 9 bis 9,5 angehoben und die Kopplung durch den sofortigen Zusatz von 8 mg IgG - gelöst in 1 ml 0,01 mol Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 - in Gang gesetzt werden. Die Kopplungsreaktion wurde 2 h bei Zimmertemperatur unter ständigem Rühren durchgeführt. Durch Zugabe von 0,1 ml frisch hergestellter Natriumborohydridlösung (4 mg/ml Aqua dest.) erfolgte die Stabilisierung der entstandenen Schiffischen Basen (2 h bei 4° C).

Mittels Gelfiltration an Sephacryl S-200 (Pharmacia) wurde das Kopplungsprodukt gereinigt (Säule: 2,6 x 80 cm).

Die Elution erfolgte mit PBS und einem Durchfluß von 10 ml/h. Zur Analyse wurde der Quotient RZ, definiert als Extinktion bei 403 nm/Extinktion bei 280 nm, für die einzelnen Fraktionen (2 ml) ermittelt. RZ ist Ausdruck des

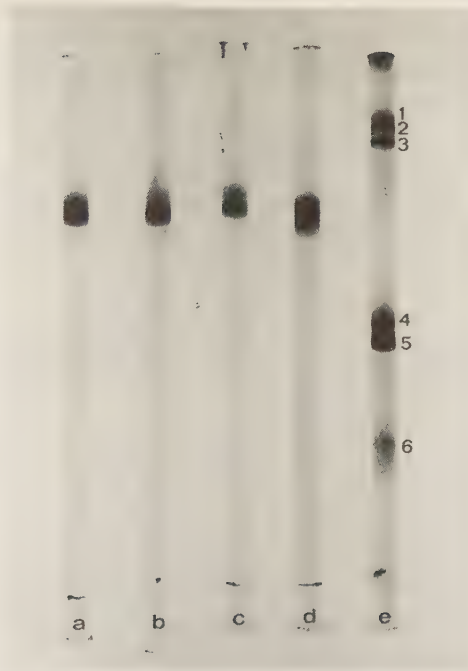


Abbildung 8: Prüfung von anti-SEB-Schaf IgG und Kaninchen IgG auf Homogenität (SDS-PAGE)

- a: Schaf IgG (Fraktion I),
- b: Schaf IgG (Fraktion IIa),
- c: Schaf IgG (Fraktion IIb),
- d: Kaninchen IgG (Fraktionen Ia - IIa),
- e: Eichproteine,
- 1: Thyroglobulin (669 000),
- 2: Ferritin (440 000),
- 3: Thyroglobulin (Half Unit) (330 000),
- 4: Albumin (67 000),
- 5: Katalase (60 000),
- 6: Lactatdehydrogenase (36 000)

Verhältnisses von Hämingehalt im Enzym (403 nm) zu Proteingehalt (280 nm).

Fraktionen, deren RZ zwischen 0,3 und 0,6 lag, wurden vereinigt. Die Einstellung des Proteingehaltes im Pool auf 1 % erfolgte durch Zusatz von bovinem Serumalbumin (Sigma A 7030). Diese Konjugate lagerten portioniert bei -20° C oder -80° C.

3.2.2 Ergebnisse

Die Auftrennung des Schaf IgG-Enzym-Kopplungsgemisches mittels Gelfiltration ist in Abbildung 9 dargestellt. Fraktionen mit einem RZ von 0,3 bis 0,6 (Pool) wurden vereinigt und im enzymimmunologischen Verfahren verwendet.

Die Reinigung des Kaninchen IgG-Enzym-Konjugates erbrachte, wie aus Abb. 10 ersichtlich, analoge Ergebnisse.

3.4 Nachweis von SEB im enzymimmunologischen Verfahren (Sandwich-ELISA)

3.4.1 Material

Folgende Geräte, Reagenzien und Lösungen wurden zur Durchführung des enzymimmunologischen Verfahrens eingesetzt:

- Microtiterplatten (Dynatech)
- Multikanalpipette (Dynatech)
- 12-Kanalwaschgerät, Immunowash 12 (Nunc)
- Taumelgerät, Reax 3 (Heidolph) zur Bewegung der Platten während Absättigung, SEB- bzw. Protein A- und Konjugatinkubation
- Microelisa Autoreader MR 580 (Dynatech)
- bovines Serumalbumin (BSA, Sigma A 7030)

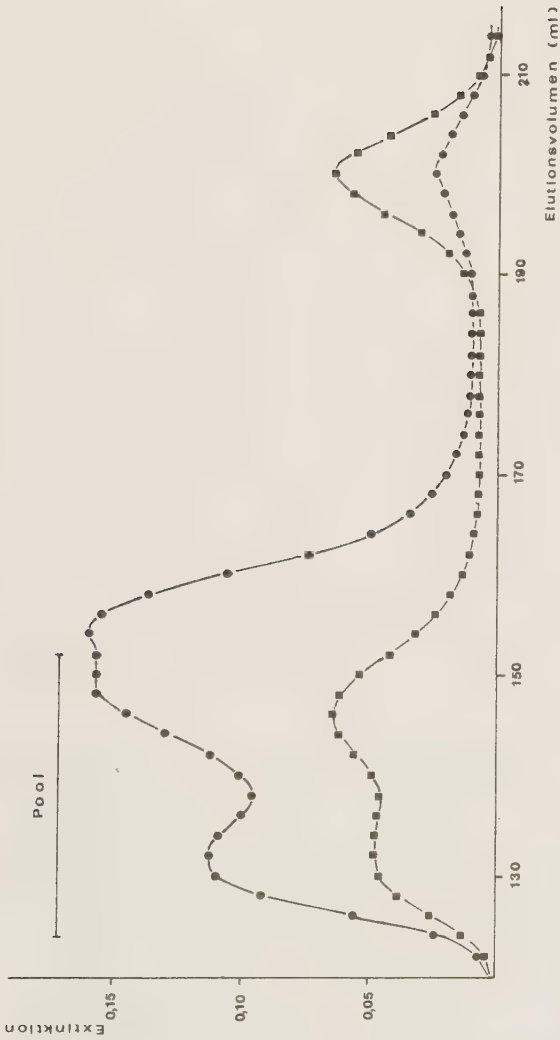


Abbildung 9: Gelfiltration eines Schaf IgG-Enzym-Kopplungsgemisches
an Sephadryl S-200

● Extinktion 280 nm

■ Extinktion 403 nm

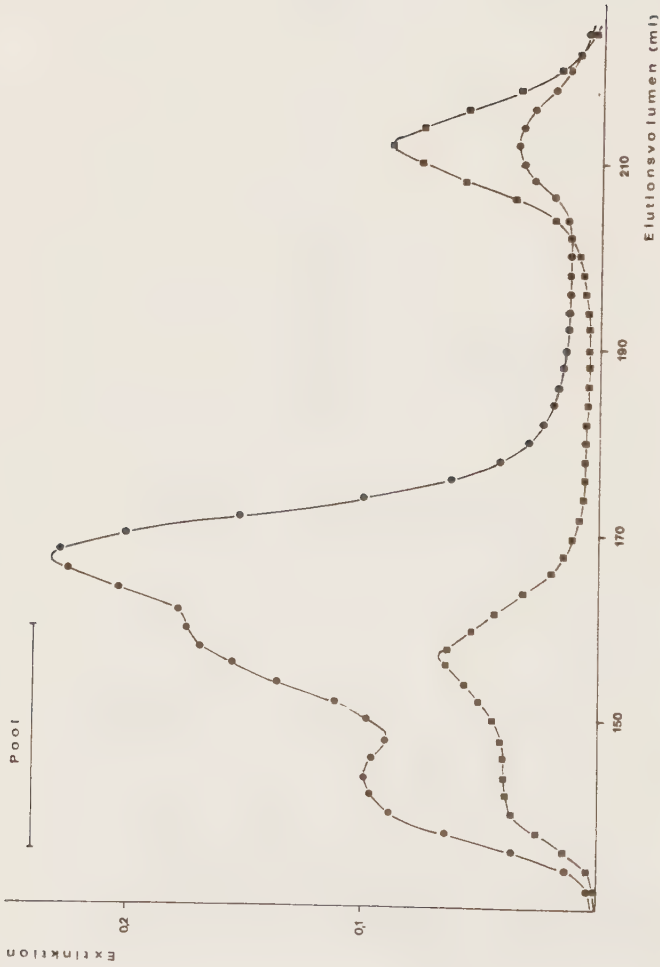


Abbildung 10: Gelfiltration eines Kaninchen IgG-Enzym-Kopplungsgemisches an Sephacryl S-200

● Extinktion 280 nm

■ Extinktion 403 nm

- Tween 20 (Sigma)
- Protein A (LKB)
- SEB (siehe 3.1.1)
- anti-SEB-Schaf IgG und Kaninchen IgG (siehe 3.2)
- Konjugate (siehe 3.3): anti-SEB-Schaf IgG-Meerrettich-peroxidase (Schaf IgG-POD) und Kaninchen IgG-Meerrettich-peroxidase (Kaninchen IgG-POD)
- ortho-Phenylendiamin (Sigma P 3888)
- ortho-Phenylendiamin (Merck 7243)
- Beschichtungspuffer: 0,1 mol Natriumcarbonatbicarbonatpuffer, pH 9,6
- Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen: 2 % BSA-PBS
- Inkubationspuffer für Antigen und Konjugat: PBS mit Zusatz von 0,05 % Tween 20 (PBS-Tween)
- Waschlösung: NaCl-Tween zum fünfmaligen Waschen der Platten nach den einzelnen Testschritten
- Substratlösung 1: 0,05 mol Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0 mit 2,5 mmol OPD (Sigma) und 4 mmol H_2O_2 (kurz vor Gebrauch ansetzen)
- Substratlösung 2 (nach GALLATI und BRODBECK, 1982): 0,05 mol Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0, mit 15 mmol OPD (Merck) und 5 mmol H_2O_2 (kurz vor Gebrauch ansetzen).

3.4.2 Herstellung des Immunosorbens

Zunächst sollte die optimale Kaninchen IgG- bzw. anti-SEB-Schaf IgG-Konzentration zur Beschichtung der Microtiterplatten ermittelt werden.

3.4.2.1 Methodik

Kaninchen IgG (Platte 1) bzw. anti-SEB-Schaf IgG (Platte 2)

wurde hierzu in 1 : 2 Verdünnungsstufen (100 µl/Kavität) in Beschichtungspuffer 3 h bei 37° C gehalten und 1 h bei Zimmertemperatur mit 2 % BSA-PBS abgesättigt.

In der Platte 1 wurden nun 100 µl Protein A in PBS-Tween (200 ng/ml) und in der Platte 2 100 µl SEB in PBS-Tween (100 ng/ml) in Dreifachansätzen 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Als Nullwert diente ein Ansatz mit PBS-Tween.

Nach Zusatz von Kaninchen IgG-POD (100 µl/Kavität der Platte 1; 1 : 700 verdünnt) bzw. von Schaf IgG-POD (100 µl der Platte 2; 1 : 1200 verdünnt) folgte eine ebenfalls einstündige Inkubation bei Zimmertemperatur.

Dann wurde Substratlösung 1 (100 µl) in die Platten gegeben und die Enzym-Substrat-Reaktion nach 15 min mit 1,25 mol H_2SO_4 gestoppt. Der Nachweis gebundener Enzymaktivität erfolgte durch Extinktionsmessung bei 490 nm.

3.4.2.2 Ergebnisse

Im Sandwichverfahren banden sich die Enzymkonjugate, eine gleichbleibende SEB-Konzentration vorausgesetzt, bei einer Beschichtung der Microtiterplatten im Bereich von 10 µg Schaf IgG/ml am stärksten (Abb. 11). Beschichtungen mit höheren IgG-Konzentrationen hatten eine Abnahme der Konjugatbindung zur Folge.

Zur Beschichtung der Microtiterplatten mit unspezifischem Kaninchen IgG wurde das Antigen durch Protein A, das sich an Rezeptoren am Fc-Teil des IgG-Moleküls bindet, ersetzt. Die Beschichtungsversuche zeigten, wie in Abb. 12 dokumentiert, analoge Ergebnisse zu obigen Resultaten; allerdings nahm die Konjugatbindung mit steigenden Beschichtungskonzentrationen stärker zu.

Um im immunologischen Verfahren möglichst viel Toxin bzw. Protein A an die Festkörperphase zu binden, erfolgte die Beschichtung der Platten für die folgenden Versuche mit 8 µg Schaf IgG/ml bzw. 5 µg Kaninchen IgG/ml.

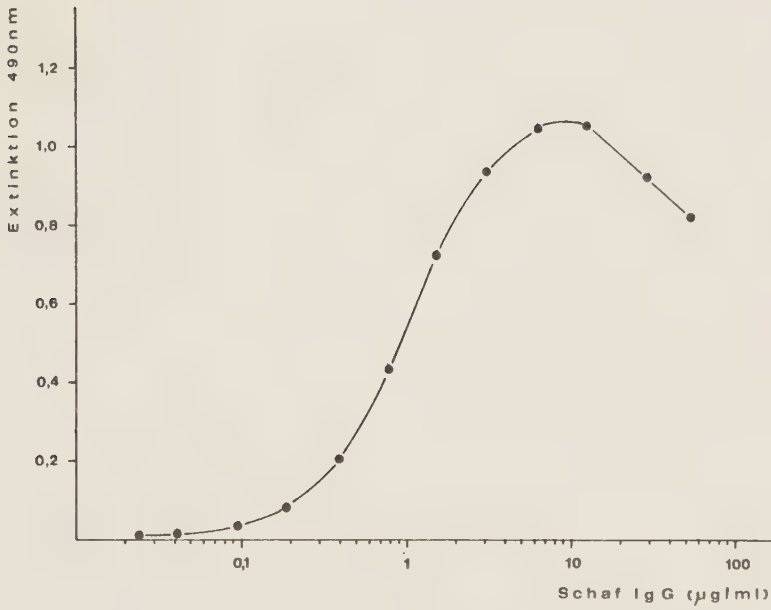


Abbildung 11: Einfluß der Beschichtungskonzentration von Schaf IgG auf das Bindungsvermögen des Enzymkonjugates

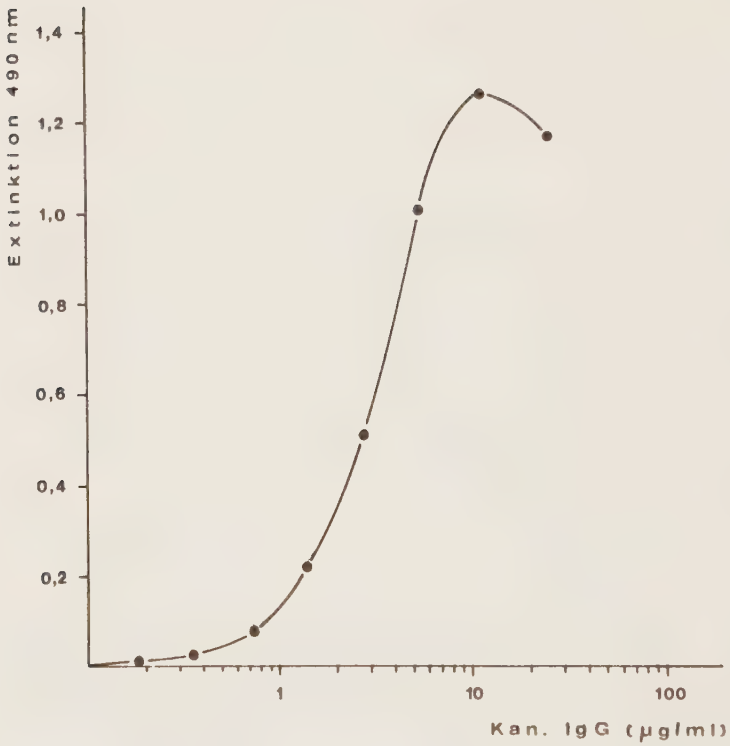


Abbildung 12: Einfluß der Beschichtungskonzentration von Kaninchen IgG auf das Bindungsvermögen des Enzymkonjugates

3.4.3 Interferenzen durch Protein A im Sandwichverfahren

Protein A, ein Exoprodukt von *Staphylococcus aureus*-Stämmen, kann durch unspezifische Bindung an den Fc-Teil der IgG-Moleküle zu Interferenzen beim Nachweis von Enterotoxinen im Sandwichverfahren führen (NOTERMANS et al., 1982).

Daher sollte zunächst geprüft werden, inwieweit Protein A bei Verwendung von Schaf IgG an Stelle von Kaninchen IgG den spezifischen Nachweis von SEB im Sandwichverfahren beeinflussen kann.

3.4.3.1 Methodik

Nach der Beschichtung zweier Microtiterplatten mit 5 µg Kaninchen IgG/ml und zweier Platten mit 8 µg Schaf IgG/ml erfolgte zunächst ein Waschschrift und die Absättigung der Platten.

Dreifachansätze von Protein A (100 µl/Kavität) in 1 : 3 Verdünnungsstufen, ausgehend von 1 µg Protein A/ml, konnten dann 1 h bei Zimmertemperatur mit dem Immunosorbens reagieren (Nullwerte: PBS-Tween).

Danach wurden 100 µl Kaninchen IgG-POD (Versuche 1 und 2) bzw. 100 µl Schaf IgG-POD (Versuche 3 und 4) ebenfalls 1 h inkubiert. Die wechselseitige Kombination von IgG und IgG-POD der beiden Tierspezies in den Versuchen 1 bis 4 ist aus Tab. 9 ersichtlich. Protein A- und Konjugatverdünnungen (1 : 1100) wurden in PBS-Tween angelegt.

Zur Ermittlung gebundener Peroxidaseaktivität wurde die Enzym-Substrat-Reaktion (Substratlösung 1) nach 15 min gestoppt und der Substratumsatz photometrisch (490 nm) ermittelt.

Tabelle 9: Kombinationen von IgG und IgG-POD von Kaninchen und Schaf zur Ermittlung von Protein A-Bindungen im Sandwichverfahren

Versuch	IgG	Konjugat
1	Kaninchen	Kaninchen IgG-POD
2	Schaf	Kaninchen IgG-POD
3	Kaninchen	Schaf IgG-POD
4	Schaf	Schaf IgG-POD

3.4.3.2 Ergebnisse

Inwieweit sich Protein A an Schaf bzw. Kaninchen IgG im Sandwich-Enzymimmunotest binden konnte, ist aus Abb. 13 ersichtlich.

Wurde die Platte mit Kaninchen IgG beschichtet und gleichzeitig Kaninchen IgG-Enzym-Konjugat verwendet, reagierten bereits 10 ng Protein A/ml positiv. Schaf IgG in Verbindung mit einem Kaninchen IgG-Enzym-Konjugat zeigte hingegen weniger deutliche Reaktionen.

Bei Verwendung des Schaf IgG-Enzym-Konjugates war die Protein A-Bindung in Verbindung mit einer Kaninchen IgG-Festkörperphase deutlich vermindert, während mit einer Schaf IgG-Beschichtung keine Bindungen mehr festgestellt werden konnten.

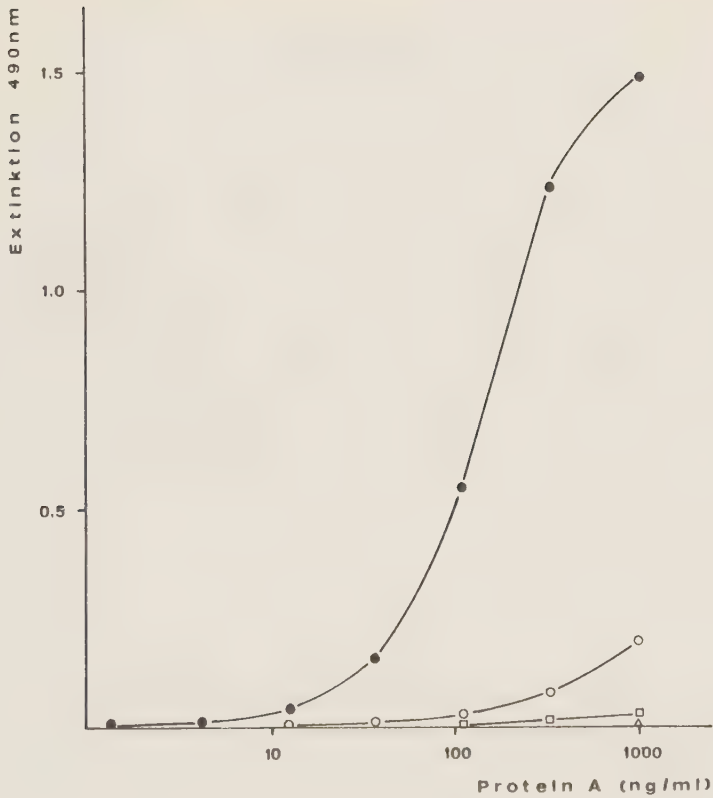


Abbildung 13: Vergleich der Protein A-Bindung im Sandwich-ELISA bei Verwendung von Kaninchen IgG und Schaf IgG

- Kaninchen IgG-Protein A-Kaninchen-Konjugat
- Schaf IgG-Protein A-Kaninchen-Konjugat
- Kaninchen IgG-Protein A-Schaf-Konjugat
- △ Schaf IgG-Protein A-Schaf-Konjugat

3.4.4 Optimierung der Enzymbestimmung

3.4.4.1 Methodik

Zwei Microtiterplatten wurden mit 8 µg Schaf IgG/ml beschichtet, gewaschen, abgesättigt und anschließend mit 100 µl SEB/Kavität (Dreifachansätze) in 1 : 3 Verdünnungsstufen 1 h bei Zimmertemperatur auf dem Taumler inkubiert (Nullwerte: PBS-Tween). Es folgte eine analoge Inkubation von Schaf IgG-POD (1 : 1100 in PBS-Tween verdünnt). Die Enzymaktivität wurde in Platte 1 mit Substratlösung 1, in Platte 2 mit Substratlösung 2 nach 15minütiger Inkubation und Zusatz von Stoppreagenz durch Extinktionsmessung bei 490 nm bestimmt.

3.4.4.2 Ergebnisse

Wie in Abb. 14 dokumentiert ist, konnte bei einer Reaktionsdauer von 15 min mit der Substratlösung 2 nach GALLATI und BRODBECK (1982) ein wesentlich empfindlicherer Nachweis geringer Enzymaktivitäten als mit der bislang verwendeten Substratlösung 1 erzielt werden. Bei Standardisierung des enzymimmunologischen Verfahrens wurden daher Meerrettichperoxidaseaktivitäten mit der Substratlösung 2 bestimmt.

3.4.5 Standardisierung

3.4.5.1 Methodik

Microtiterplatten wurden mit 8 µg Schaf IgG/ml (100 µl/Kavität) 3 h bei 37° C beschichtet, über Nacht bei 4° C belassen und anschließend gewaschen. Es folgte eine 30minütige

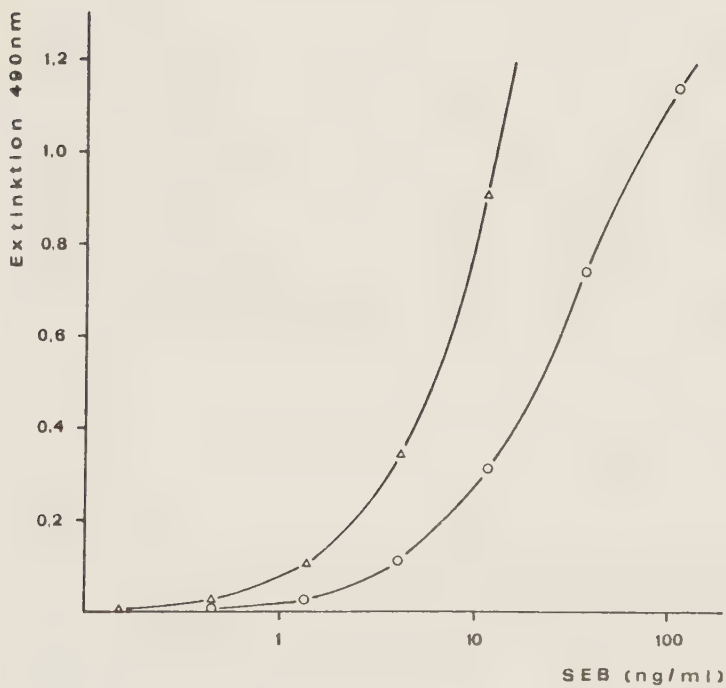


Abbildung 14: Verschiedene Substratlösungen zur Messung der Enzymaktivität im Sandwich-ELISA

- Substratlösung 1
- △ Substratlösung 2 (GALLATI und BRODBECK)

ge Absättigung freier Bindungsstellen mit 2 % BSA-PBS (250 µl/Kavität). Nach einem weiteren Waschschrift wurden Dreifachansätze von SEB (100 µl/Kavität) in 1 : 3 Verdünnungsstufen (100 - 0,045 ng SEB/ml) sowie PBS-Tween (100 µl/Kavität) zum Anlegen von vier Nullwerten 40 min auf dem Taumelgerät inkubiert. Danach erfolgte das fünfmalige Waschen der Platten. Nun werden 100 µl Schaf-IgG-POD/Kavität (1 : 1700 verdünnt) 40 min unter den gleichen Bedingungen wie das Toxin inkubiert und danach nicht gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Gebundene Peroxidaseaktivität konnte mit 100 µl Substratlösung 2/Kavität (15minütige Inkubation) nach Zusatz von Stoppreagenz (25 µl 1,25 mol H_2SO_4 /Kavität) mittels Extinktionsmessung bei 490 nm ermittelt werden.

3.4.5.2 Ergebnisse

Abb. 15 zeigt den Verlauf einer SEB-Standardkurve im Sandwich-Enzym-Immunoverfahren.

Die als vertikale Balken dargestellte Standardabweichung nahm mit steigenden Extinktionswerten zu. Als Nachweisgrenze wurde $\bar{x} + 2s$ aus den Nullwerten angenommen. Sie liegt bei 150 pg SEB/ml.

3.5 Nachweis von SEB im lumineszenzimmunologischen Verfahren (LIA)

Nach einigen Vorversuchen zeichnete sich die Möglichkeit zur Erstellung eines hochwertigen lumineszenzimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von SEB insbesondere mit der zur Herstellung von Konjugaten beschriebenen Kopplung eines Isoluminolderivates an IgG ab.

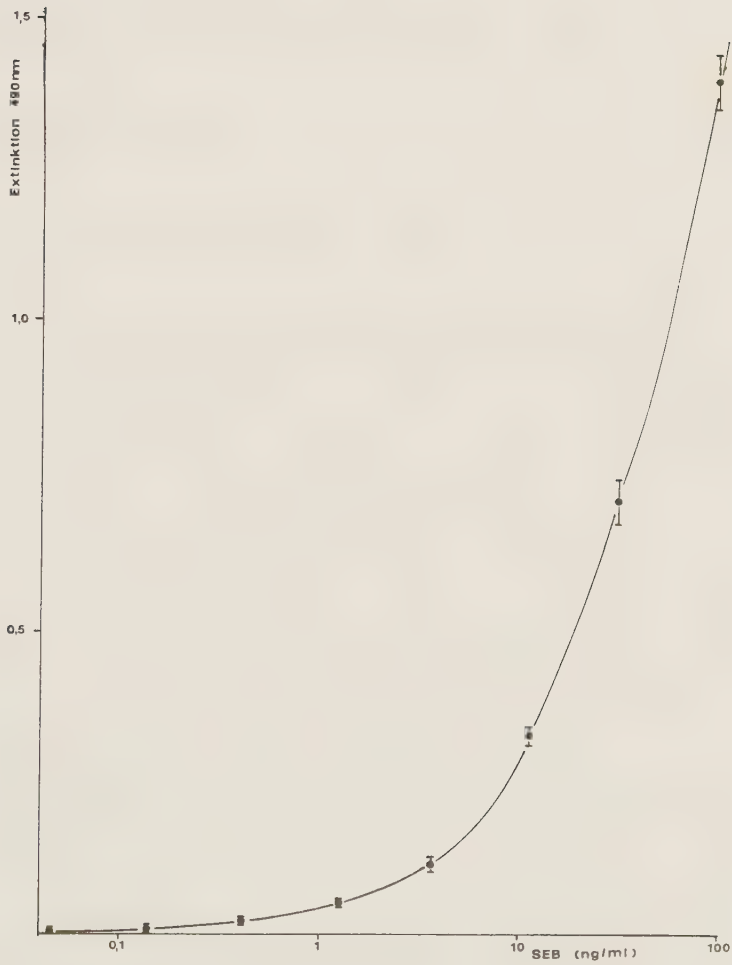


Abbildung 15: Standardkurve zum Nachweis von SEB mittels Sandwich-ELISA

3.5.1 Material

Zur Kopplung wurden N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminol-hemisuccinamid (ABEI-H; LKB), N-Hydroxysuccinimid (Sigma), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma) sowie über Molekularsieb 4 Å aufbewahrtes Dimethylformamid (Merck) verwendet. Kopplungsprodukte wurden an Sephadex G-25 fine (Pharmacia) gereinigt.

Im LIA wurden folgende Geräte, Reagenzien und Lösungen eingesetzt:

- Polystyrenröhrchen, 47 x 12 mm (ABIMED)
- Multipette 4780 (Eppendorf)
- Taumelgerät, Reax 3 (Heidolph) zur Bewegung der Röhrchen während Absättigung, SEB- bzw. Protein A- und Konjugatinkubation
- Luminometer Biolumat LB 9500T (Berthold)
- bovines Serumalbumin (BSA; Sigma A 7030)
- Tween 20 (Sigma)
- Protein A (LKB)
- SEB (siehe 3.1.1)
- anti-SEB-Schaf IgG (siehe 3.2)
- Microperoxidase MP-11 (Sigma)
Stammlösung: 1 mg/ml in 10 mmol Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
Arbeitsverdünnung: 5 µmol in PBS
- Beschichtungspuffer: 0,1 mol Natriumcarbonat-bicarbonatpuffer, pH 9,6
- Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen: 2 % BSA-PBS
- Inkubationspuffer für Antigen und Konjugat: PBS-Tween
- Waschlösung: NaCl-Tween zum Waschen der Röhrchen (2 x 1 ml)
- Oxidationssystem zur Lumineszenzenerzeugung (SCHROEDER und YEAGER, 1978):
Vorlage von 200 µl 2 mol NaOH (Konjugatcharakterisierung)

bzw. von 200 μ l 0,05 mol Phosphatpuffer, pH 8,6 (LIA)
und 100 μ l 5 μ mol Microperoxidase in PBS
Auslösung der lumineszierenden Reaktion durch automati-
sche Injektion von 100 μ l 0,3 % H_2O_2
Integration gemessener Impulse über 10 sec.

3.5.2 Methodik

3.5.2.1 Herstellung von Konjugaten für den LIA

Das lumineszierende ABEI-H wurde nach einer von WOOD (1984) empfohlenen Methode an anti-SEB-Schaf IgG gekoppelt (Abb. 16).

Hierzu wurden zunächst 20 μ mol ABEI-H unter leichter Erwärmung, danach 20 μ mol N-Hydroxysuccinimid 30 min unter Rühren in 320 μ l Dimethylformamid (DMF) gelöst. Nach Zugabe von 60 μ mol N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 80 μ l DMF erfolgte die Esterbildung (aktiviertes ABEI-H) über 20 bis 24 h bei Zimmertemperatur und völliger Dunkelheit. Während der Reaktion, bei der es zur Bildung von Dicyclohexylharnstoffkristallen kam, wurden Proben entnommen und auf Kieselgel 60-Platten (Merck) chromatographiert. Als Fließmittel diente das von GADOW et al. (1984) verwendete Gemisch Ethylacetat/Ethanol/2,5 % Ammoniak (5 + 2 + 1).

Nach Entwicklung der Platten erfolgte eine Analyse der unter UV-Licht fluoreszierenden Substanzen auf lumineszierende Eigenschaften.

Zur Kopplung wurde dem anti-SEB-Schaf IgG (37 nmol in 750 μ l 0,02 mol Phosphatpuffer, pH 8,0) aktiviertes ABEI-H zugesetzt, wobei sofort nach Zugabe wasserunlösliche Komponenten ausfielen. Die Reaktion erfolgte 24 h bei 4° C und unter Lichtausschluß.

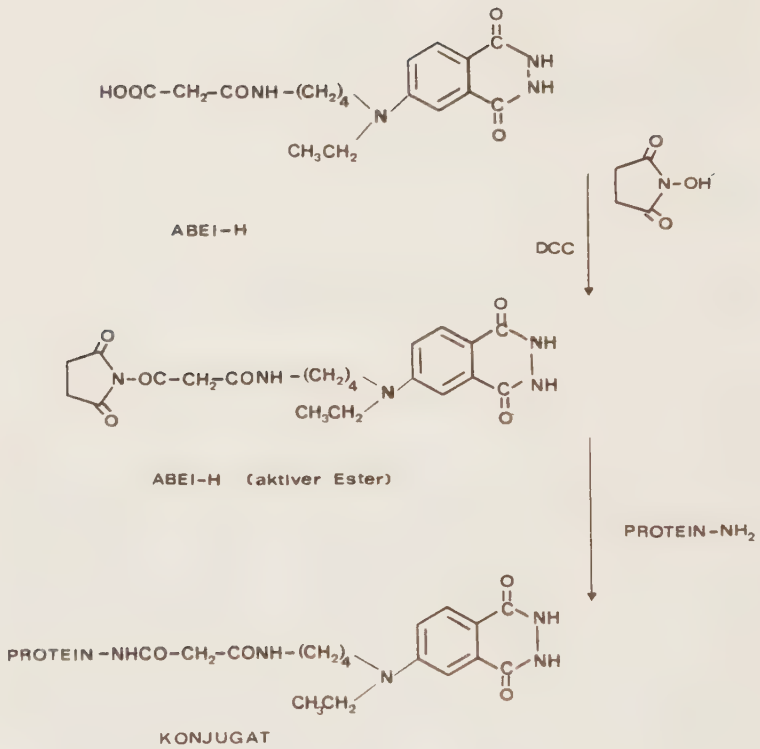


Abbildung 16: Methode zur Kopplung von ABEI-H an IgG

Die Dauer der Aktivierung von ABEI-H und die molaren Kopplungsverhältnisse (IgG : aktiviertes ABEI-H) verschiedener Kopplungsansätze sind aus der Tabelle 10 ersichtlich.

Tabelle 10: Verschiedene Ansätze zur Kopplung von ABEI-H an IgG

Ansatz	Dauer der Aktivierung von ABEI-H	Verhältnis IgG : aktiver Ester (mol/mol)	Konjugat (Code)
I	24 h	1 : 40	1 : 40 (24)
II	20 h	1 : 50	1 : 50 (20)
III	24 h	1 : 50	1 : 50 (24)
IV	24 h	1 : 60	1 : 60 (24)

Nach Zentrifugieren des Reaktionsgemisches (10 min bei 4000 U/min) wurde der Überstand mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 fine (Säule: 25 x 1,6 cm) gereinigt.

Als Elutionsmittel diente bei einem Durchfluß von 20 ml/h 0,02 mol Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 (Fraktionierung: 1,5 ml). Nach der Chromatographie erfolgte zunächst eine luminometrische Analyse aller erhaltenen Fraktionen.

Zur immunoluminometrischen Prüfung individueller Fraktionen auf spezifisches (B_m) und unspezifisches (UB) Bindungsvermögen wurden Polystyrenröhrchen mit 150 µl anti-SEB-Schaf IgG (8 µg/ml) 3 h bei 37° C beschichtet und über Nacht bei 4° C belassen.

Die Absättigung erfolgte mit 2 % BSA-PBS (500 µl/Röhrchen) für 1 h bei Zimmertemperatur. Analog wurden gleichzeitig Röhrchen zur Prüfung der unspezifischen Bindung (ohne IgG-Beschichtung) mit 2 % BSA-PBS abgesättigt.

Beschichtete Röhrchen wurden mit 100 μ l SEB (100 ng/ml PBS-Tween), lediglich abgesättigte Röhrchen (UB) mit 100 μ l PBS-Tween 1 h inkubiert.

Danach folgte eine ebenfalls einstündige Inkubation beschichteter bzw. nur abgesättigter Röhrchen mit 100 μ l Aliquoten der individuellen Fraktionen (1 : 1000 verdünnt). Die Durchführung der Versuche erfolgte im Dreifachansatz. Zur Ermittlung gebundener Aktivitäten wurde die lumineszierende Reaktion durch das Oxidationssystem nach SCHROEDER und YEAGER (1978) ausgelöst. Die Integration gemessener Impulse erfolgte mit dem Luminometer über 10 sec.

Nach Vereinigung individueller Fraktionen (1,5 ml) mit der stärksten spezifischen Bindung wurden die erhaltenen Konjugate einer analogen vergleichenden immunoluminometrischen Analyse auf B_m und UB unterzogen. Die Konjugate lagerten nach Zusatz von NaN_3 (0,02 %) portioniert bei -20°C .

3.5.2.2 Ergebnisse

Wie aus den Dünnschichtchromatogrammen zu ersehen war, erfolgte nach ungefähr 20 h keine weitere Umsetzung von ABEI-H. Alle dünnschichtchromatographisch ermittelten Substanzen (R_f -Werte: 0,05 (ABEI-H), 0,2 und 0,35 (aktiviertes ABEI-H)) erwiesen sich als lumineszierend, wobei ABEI-H und aktiviertes ABEI-H mittels der von GADOW et al. (1984) angegebenen R_f -Werte identifiziert werden konnte.

Aus den Kopplungsgemischen konnten, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 fine vier Fraktionen (I - IV) isoliert werden.

Obgleich in allen Fraktionen Lumineszenz nachgewiesen werden konnte, zeigte lediglich Fraktion I spezifisches Bindungsvermögen an SEB (Abb. 18).

Spezifisches (B_m) und unspezifisches (UB) Bindungsvermögen sowie das Verhältnis UB/B_m der verschiedenen Konjugate

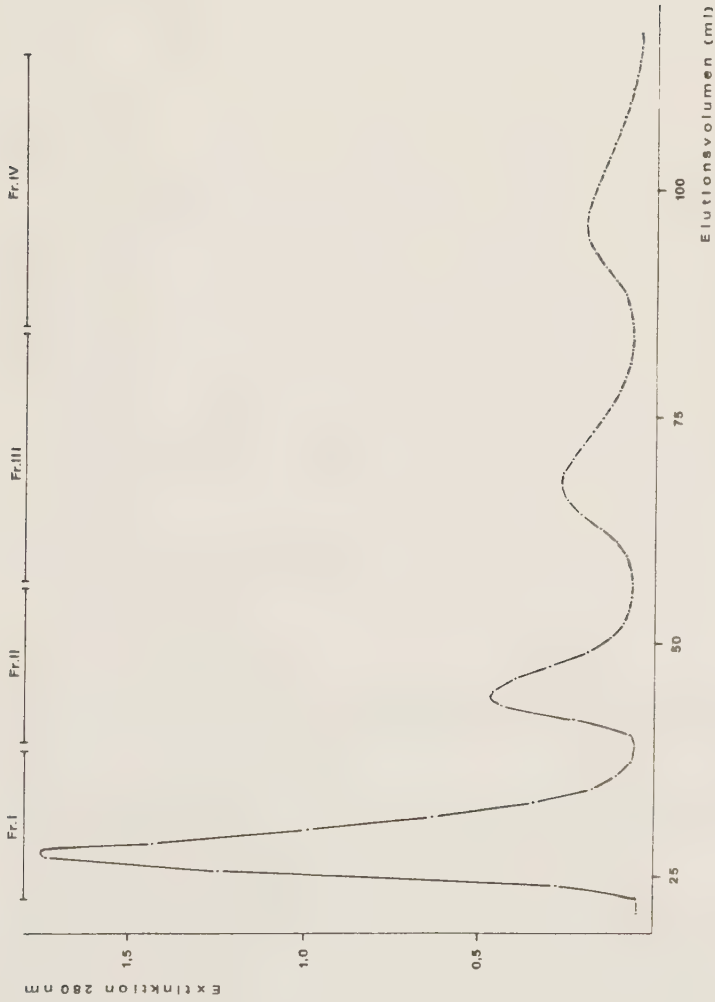


Abbildung 17: Gelfiltration eines anti-SEB-Schaf-IgG-ABEI-H-Kopplungs-
gemisches an Sephadex G-25 fine

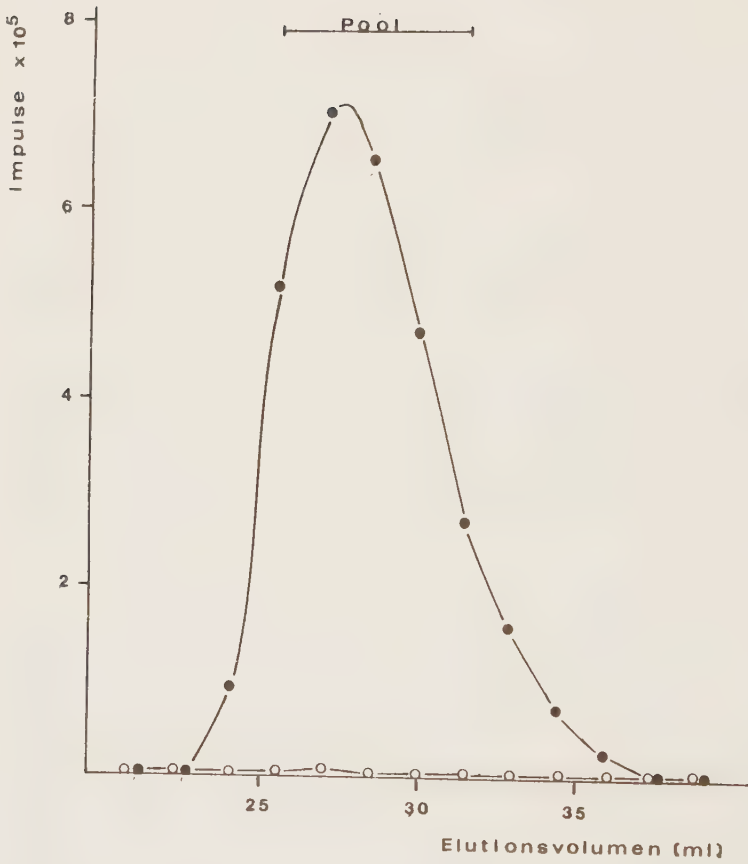


Abbildung 18: Maximale Bindung (B_m) und unspezifische Bindung (UB) von ABEI-H-IgG an SEB nach Gelfiltration an Sephadex G-25 fine

- B_m
- UB

werden aus der Tabelle 11 ersichtlich. Demnach ergab sich für den LIA das Konjugat 1 : 50 (20) als am geeignetsten.

Tabelle 11: Spezifisches (B_m) und unspezifisches (UB) Bindungsvermögen verschiedener ABEI-H-IgG-Konjugate an SEB

Konjugat (Code)	B_m Impulse $\times 10^3$	UB Impulse $\times 10^3$	UB/ B_m
1:40 (24)	272	6,9	0,02
1:50 (20)	308	7,1	0,02
1:50 (24)	264	8,0	0,03
1:60 (24)	230	2,8	0,01

3.5.3 Erstellung eines LIA zum Nachweis von SEB

3.5.3.1 Methodik

Zunächst wurde in Vorversuchen die optimale IgG-Konzentration zur Beschichtung der Röhrchen und die geeignete Konjugatverdünnung (ABEI-H-IgG, 1:50 (20)) ermittelt.

Dann wurden Polystyrenröhrchen mit 300 μ l anti-SEB-Schaf IgG (8 μ g/ml) beschichtet und mit 500 μ l 2 % BSA-PBS 1 h abgesättigt.

100 μ l SEB (Dreifachansätze) in 1 : 3 Verdünnungsstufen (100 - 0,05 ng/ml) wurden nun gleichzeitig mit 100 μ l ABEI-H-IgG (1 : 750) 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Erstellung von vier Nullwerten diente PBS-Tween. Nach einem Waschschrift wurden gebundene Aktivitäten mit dem

Microperoxidase-H₂O₂-Oxidationssystem im Luminometer gemessen. Die Integration gemessener Impulse erfolgte über 10 sec.

In zusätzlichen Versuchen wurde zur Abklärung möglicher Protein A-Interferenzen das Antigen (SEB) durch Protein A im Testverfahren ersetzt.

3.5.3.2 Ergebnisse

In Abbildung 19 ist der Verlauf einer Standardkurve (abzüglich der Reagenzblankwerte) zum Nachweis von SEB im LIA dargestellt. Bei steigender Impulszahl nimmt auch die Standardabweichung (vertikale Balken) zu.

Der Nachweis von 400 pg SEB/ml ($\bar{x} + 2s$ aus den Nullwerten) war mit vorbeschichteten Röhrchen innerhalb von 30 min möglich. Zudem erwies sich das Testsystem gegenüber Protein A-Interferenzen als stabil (nicht dokumentiert).

3.6 Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von SEB in Lebensmitteln mittels LIA und ELISA

Zur praktischen Anwendung lumineszenz- und enzymimmunologischer Verfahren sollte in orientierenden Vergleichsuntersuchungen der Nachweis von SEB in künstlich kontaminierten Lebensmitteln geführt werden.

3.6.1 Material

Für die Versuche wurden folgende Lebensmittel im Einzelhandel erworben:

- H-Vollmilch (3,5 % Fett)

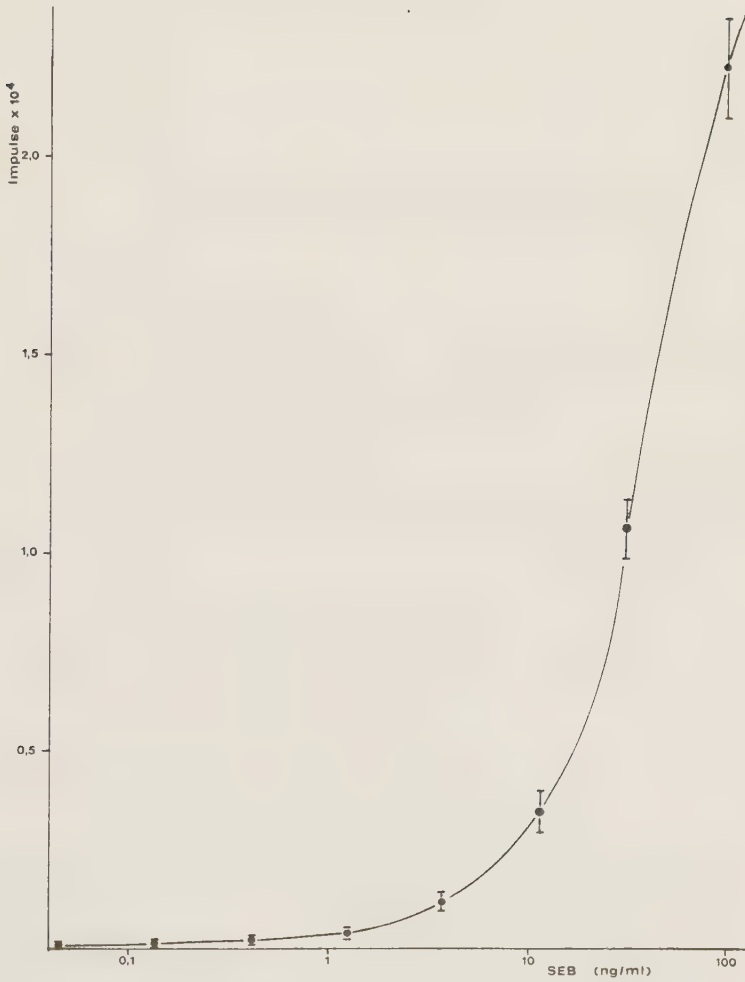


Abbildung 19: Standardkurve zum Nachweis von SEB mittels LIA

- Langkornreis
- eine Mischung aus Schweine- und Rinderhackfleisch.

Der Reis wurde für die Untersuchungen vorgekocht.

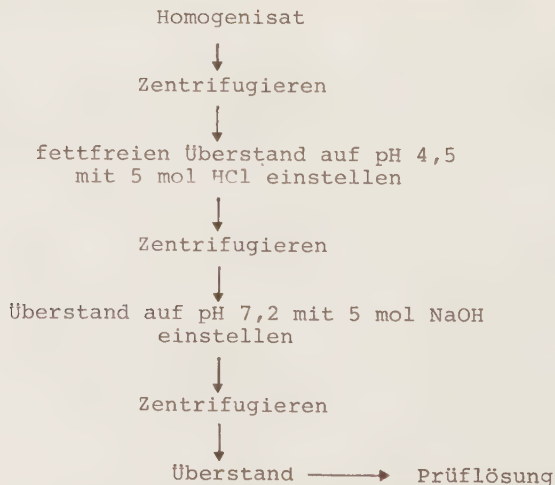
3.6.2 Methodik

3.6.2.1 Herstellung von Lebensmittelextrakten

Zur Extraktion wurden 100 g Lebensmittel (Reis oder Hackfleisch) mit 150 ml PBS in einem Labormixgerät homogenisiert. Nach Zentrifugieren der Homogenisate (10 000 U/min; 20 min bei 4° C) benötigte Reis keine weitere Aufbereitung.

Hackfleisch wurde hingegen in Anlehnung an ein Verfahren von NOTERMANS (1983) einer Säurefällung mit anschließender pH-Einstellung auf den Neutralbereich unterzogen (siehe nachfolgende Aufstellung).

Aufarbeitung von Hackfleisch zum Nachweis von SEB



Ohne Extraktion konnte lediglich Milch untersucht werden. Den Milchproben (100 ml), dem Reis (100 g) und dem Hackfleisch (100 g) wurden zur künstlichen Kontamination 0,1, 1 bzw. 5 µg SEB zugesetzt. Bei Reis und Hackfleisch erfolgte der Toxinzusatz nach dem Homogenisieren. Vor der Analyse im immunologischen Verfahren wurde den Extrakten und der Milch zudem Tween 20 bis zu einer Endkonzentration von 0,05 % zugesetzt. Die Wiederfindung von 0,1 µg SEB in 100 g bzw. 100 ml eines Lebensmittels entspricht der Anforderung an ein geeignetes Nachweisverfahren (REISER et al., 1974).

3.6.2.2 Der Nachweis von SEB in Lebensmittelextrakten mittels LIA und Sandwich-ELISA

Die künstlich kontaminierten Lebensmittel wurden vergleichend mit dem lumineszenz- und enzymimmunologischen Verfahren, wie unter 3.5.3 bzw. 3.4.5 beschrieben, untersucht.

Zur Erstellung adäquaterer Standardkurven wurde jedoch der Inkubationspuffer für SEB mit toxinfreiem Extrakt des untersuchten Lebensmittels bzw. mit Milch ohne Toxinzusatz ersetzt. Ebenso wurden Negativkontrollen zur Ermittlung der Nachweisgrenzen ($\bar{x} + 2s$) mit nicht kontaminiertem Extrakt bzw. toxinfreier Milch angelegt. Nach der gleichzeitigen Analyse der einzelnen Proben (Dreifachansätze) mittels der beiden Nachweisverfahren konnte der Toxingehalt anhand täglich neu erstellter Standardkurven graphisch ermittelt werden.

Die Untersuchung der Lebensmittel erfolgte bei gleichen Toxinzusätzen in drei Extraktionsansätzen (I - III).

3.6.3 Ergebnisse

Die mittels LIA und ELISA in künstlich mit SEB kontaminierten Lebensmitteln wiedergefundenen Toxinmengen sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Dabei konnte in jedem Fall der zur Aufklärung von Lebensmittelvergiftungen geforderte Nachweis von 0,1 µg SEB/100 g bzw. 100 ml Lebensmittel geführt werden. Die Verwendung entsprechender Lebensmittel-extrakte zum Anlegen der Negativwerte führte zu keiner Verminderung der Nachweisempfindlichkeit, womit gezeigt werden konnte, daß trotz einfacher Aufarbeitung eine Eliminierung von Störfaktoren aus dem Untersuchungsmaterial möglich ist.

Das Toxin konnte bei zufriedenstellender Wiederfindung in einer zur kurzen Bestimmungsdauer erforderlichen Zeit extrahiert werden, wobei allerdings mit Zunahme der Extraktionsschritte eine Abnahme der Wiederfindungsraten beobachtet wurde. Der Toxinnachweis mittels LIA und ELISA führte mit beiden Verfahren zu vergleichbaren Resultaten. Abweichungen der Wiederfindungsraten verschiedener Ansätze innerhalb einer Methode und zwischen den Verfahren sind weniger auf die Testsysteme selbst, als auf unterschiedlich starke Toxinverluste während der Extraktion, die Instabilität hochgereinigten Toxins und nicht zuletzt die manuelle graphische Ermittlung der Toxingehalte zurückzuführen. Diese Faktoren können sich im ungünstigsten Fall summieren und zu beachtlichen Abweichungen der Wiederfindungsraten führen.

Mit dem LIA konnte ein gegenüber dem ELISA einfacheres Verfahren (nur ein Waschschrift nach der Absättigung freier Bindungsstellen, keine Substratinkubation) mit extrem kurzer Bestimmungsdauer (30 min nach erfolgter Absättigung) und ausreichender Nachweisempfindlichkeit eingesetzt werden. Der Zeitaufwand für den ohnehin schon schnellen enzym-immunologischen Nachweis beträgt 90 min nach Absättigung.

Tabelle 12: Nachweis von SEB in künstlich mit dem Toxin kontaminierten Lebensmitteln mittels ELISA und LIA bei verschiedenen Extraktionsansätzen (I - III)

Zusatz von SEB µg/100 ml bzw. 100 g Lebens- mittel	Nachweis- methode	Wiederfindungsrate an zugesetztem SEB (%)								
		Milch			Reis			Hackfleisch		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
0,1	ELISA	100	100	100	100	70	70	50	60	60
	LIA	110	100	110	160	70	90	50	80	80
1,0	ELISA	46	140	62	93	81	40	48	63	66
	LIA	92	160	50	91	68	144	69	117	66
5,0	ELISA	136	132	120	58	114	90	63	108	105
	LIA	116	144	74	87	78	105	51	88	54

4. DISKUSSION

Der Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln wird derzeit meist noch mit relativ zuverlässigen Gelpräzipitationsmethoden geführt, die jedoch lange Inkubationszeiten und insbesondere langwierige Extraktions-, Reinigungs- und Konzentrierungsschritte notwendig machen. Beim radioimmunologischen Verfahren (MILLER et al., 1978) entfiel ein erheblicher Teil dieses Aufwandes bereits. Es ermöglicht zwar einen empfindlichen und schnellen Toxinnachweis, ist aber abhängig von einem Speziallabor, das den Sicherheitsbedingungen zum Arbeiten mit radioaktiven Stoffen genügen muß. Deshalb ersetzten SIMON und TERPLAN (1977) den radioaktiven Marker durch ein Enzym und erarbeiteten ein enzymimmunologisches Verfahren (ELISA), das auch unter einfachen Bedingungen die schnelle und quantitative Bestimmung von Toxin ermöglichte. Durch Einsatz von Microtiterplatten in Verbindung mit einem Spezialgerät zur automatischen Auswertung konnte die Durchführung des Enzymimmunotests mittlerweile weitgehend rationalisiert werden.

Mögliche Beeinträchtigungen der Enzymaktivität durch Bestandteile des Probenmaterials sowie die Notwendigkeit von Substratinkubationszeiten im enzymimmunologischen Verfahren und die Schwierigkeit, ein geeignetes konservierendes Reagens für die Lagerung von Enzymkonjugaten zu finden, ließen die Entwicklung eines lumineszenzimmunologischen Verfahrens (LIA) mit einem einfacheren Ablauf zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen sinnvoll erscheinen. Zudem haben neueste Untersuchungen (WOOD 1984) gezeigt, daß sich der LIA, bei dem als Marker luminogene Substanzen dienen, in der Routinediagnostik durch geringe Störanfälligkeit, hohe Genauigkeit und insbesondere durch kurze Bestimmungsdauer auszeichnet. Zur Auswertung wird allerdings ein Luminometer mit einem Detektor (Photomultiplier) für Licht-

messung benötigt. Die zunehmende analytische Bedeutung der Lumineszenzmessung und ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dürften jedoch in naher Zukunft zu einer stärkeren Verbreitung dieser Geräte führen.

Es wurde deshalb, nach Entwicklung einer geeigneten Kopplungsmethode zur Herstellung von Konjugaten, ein lumineszenzimmunologisches Verfahren zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) aus Lebensmitteln entwickelt und mit einem enzymimmunologischen verglichen. Bereits nach Abstimmung der Testsysteme wurde versucht, unter Beachtung von Protein A-Interferenzen, die Reaktionszeit möglichst zu minimieren, die Durchführung der Verfahren zu vereinfachen und zudem ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erzielen.

Zur Antiserumgewinnung wurden Schafe in weitgehender Anlehnung an ein Schema von NOTERMANS (1982) mit SEB immunisiert. Die Immunantwort konnte vergleichend mit Hilfe der Präzipitations- und der indirekten ELISA-Technik analysiert werden. Obwohl die Kontrolle der anti-SEB-Immunantwort mit beiden Techniken eine annähernd gleiche Kinetik ergab, ist es dennoch sinnvoll, bei beabsichtigter Verwendung der Antisera im immunologischen Verfahren den Immunisierungsverlauf mit der indirekten ELISA-Technik zu kontrollieren, weil damit die relevante Population an bindenden Antikörpern adäquat erfaßt werden kann.

Die Gewinnung diagnostischer Antisera war in den Versuchen bei allen Tieren bereits nach der ersten Restimulierung möglich. Mit wiederholten Stimulierungen nach beginnendem Titerabfall konnte zudem eine weitere Steigerung der Immunantwort erzielt werden.

Insgesamt wurde gezeigt, daß die Immunisierung von Schafen mit einem geringeren Toxinaufwand (0,6 mg SEB/Tier) und einer wesentlich höheren Serumausbeute durchgeführt werden kann, als dies bei den bislang zur Herstellung von Antisera gegen Staphylokokken-Enterotoxine verwendeten Ver-

suchstier Kaninchen (2 bis 3 mg SEB/Tier) möglich war. Dies hat insbesondere bei der Antiserumherstellung gegen die nur in sehr geringer Menge verfügbaren Serotypen D und E der Toxine eine erhebliche praktische Bedeutung.

Zur optimalen Konjugatherstellung für LIA und ELISA war die Isolierung von anti-SEB-Schaf IgG mittels Ionenaustauschchromatographie notwendig. Zudem wurde Kaninchen IgG verwendet, um vergleichende Untersuchungen zur Protein A-Bindung im Sandwich-ELISA zu ermöglichen. Die Chromatographie erfolgte an DEAE-Trisacryl M, das eine synthetische Matrix besitzt, um langwieriges Äquilibrieren und Regenerieren mit herkömmlichen Gelen zu vermeiden. Isolierte Immunglobuline wurden immunoelektrophoretisch charakterisiert und mittels SDS-Gelelektrophorese auf Homogenität geprüft. Die rasche Reinigung von Schaf IgG und Kaninchen IgG mit Trisacryl M wurde vor kurzem unter optimierten Bedingungen durch die Untersuchungen von CORTIER et al. (1984) bestätigt.

Eine weitere Anreicherung der Seren mittels Affinitätschromatographie wäre wegen der gelegentlichen natürlichen Besiedlung von Versuchstieren mit Staphylokokken und damit verbundenen geringen Antikörperaktivitäten für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin zwar wünschenswert, ist aber mit den geringen Mengen an verfügbarem Toxin nicht praktikabel.

In der Zukunft wird diese Imponderabilität durch die Verwendung monoklonaler Antikörper, deren Produktion sich zur Zeit in verschiedenen Forschungseinrichtungen im experimentellen Stadium befindet (MEYER et al. 1984), ausgeschaltet werden können. Bisher liegen allerdings noch keine befriedigenden Ergebnisse vor.

Meerrettichperoxidase, ein Glykoprotein mit einem nicht an der Enzymaktivität beteiligten Kohlenhydratanteil (NAKANE und KAWAOI, 1974), wurde nach der Methode von WILSON und

NAKANE (1978) an anti-SEB-Schaf IgG bzw. Kaninchen IgG gekoppelt. Durch Oxidation der CHOH-Gruppen im Enzym mittels Natriumperjodat wurden Aldehydgruppen in das Molekül eingeführt, die unter Bildung Schiffscher Basen mit den Amino-
gruppen im IgG reagierten. Die Stabilisierung der Schiff-
schen Basen erfolgte durch Reduktion. Nach Reinigen des
IgG-Enzym-Kopplungsgemisches mittels Gelfiltration wurden
Fraktionen mit einer Reinheitszahl (RZ) von 0,3 bis 0,6
im enzymimmunologischen Verfahren verwendet. Dieser RZ-Wert
entspricht nach WILSON und NAKANE (1978) der zur optimalen
Konjugatherstellung notwendigen Kopplung von 1 bis 2 Enzym-
molekülen an ein IgG-Molekül.

Nachfolgende Fraktionen sind wegen des niedrigen RZ-Wertes
als ungekoppeltes Immunglobulin zu interpretieren, während
das zuletzt eluierte ungekoppelte Enzym durch die hohe
Reinheitszahl charakterisiert werden konnte.

Das luminogene N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminolhemisuc-
cinamid (ABEI-H) wurde zur Konjugatherstellung für den LIA
durch Esterbildung mit N-Hydroxysuccinimid für eine Bin-
dungsreaktion aktiviert und ohne weitere Reinigung unter
milden, nicht oxidativen Bedingungen an das anti-SEB-Schaf
IgG gekoppelt. Nach 20stündiger Veresterung konnte aus dem
Reaktionsgemisch aktiviertes und in geringer Menge nicht
umgesetztes ABEI-H mit Hilfe der von GADOW et al. (1984)
angegebenen R_f -Werte dünnschichtchromatographisch identi-
fiziert werden. Das Auftreten einer weiteren dünnschicht-
chromatographisch nicht näher identifizierbaren luminogenen
Substanz kann auf Nebenreaktionen bei der Umsetzung von
ABEI-H mit Carbodiimid zurückgeführt werden.

Nach der Kopplung wurde das ABEI-H-IgG-Konjugat mittels
Gelfiltration isoliert und durch sein spezifisches Bin-
dungsvermögen charakterisiert.

In den restlichen Fraktionen wurden lumineszierende Substan-
zen eluiert, die anhand des Chromatogramms als tri-, di-
und monomeres ABEI-H angesprochen werden können. Zudem

konnten SCHROEDER et al. (1981a) die Selbstkopplung der durch Veresterung aktivierten Isoluminolderivate über die Stickstoffgruppen im Phthalhydrazidring experimentell be- weisen.

Ein Vergleich verschiedener Kopplungsansätze ergab in al- len Fällen ein günstiges Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer Bindung (UB/B_m) in der immunoluminometrischen Analyse, während eine maximale spezifische Bindung (B_m) nach 20stündiger Veresterung von ABEI-H mit einem molaren Kopplungsverhältnis (IgG : aktiver Ester) von 1 : 50 er- zielt werden konnte. Die Ergebnisse stimmen mit dem kürz- lich von BARNARD et al. (1984) und GADOW et al. (1984) an- gegebenen molaren Kopplungsverhältnis von 1 : 50 bzw. von etwa 1 : 60 zur optimalen Konjugatherstellung überein.

Da diese Methode wegen milder Reaktionsbedingungen unter Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen bifunktioneller Reagenzien zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der immunologischen Aktivität führt und im Gegensatz zur Diazo- tierung (SIMPSON et al. 1979) auch die lumineszierenden Eigenschaften der Markermoleküle nicht beeinträchtigt, ist sie zur Kopplung zyklischer Diacylhydrazide an Proteine bestens geeignet. Ob jedoch durch Verwendung luminogener Acridiniumester zur Konjugatherstellung eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und eine Vereinfachung des lu- mineszenzimmunologischen Verfahrens erzielt werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft, zumal diese Substanzen noch nicht kommerziell erhältlich sind. WEEKS et al. (1983a) erstellten mit diesen Markern ein einfa- ches Testverfahren mit sehr kurzer Bestimmungsdauer und ho- her Nachweisempfindlichkeit.

Die Fähigkeit von Polystyren, Proteine durch unspezifische physikalische Bindungskräfte zu adsorbieren, ermöglichte eine einfache und schnelle Bildung von Festkörperphasen für das immunologische Verfahren.

In Versuchen zur Ermittlung der optimalen Beschichtungskonzentration von Microtiterplatten und Polystyrenröhrchen konnte eine Zunahme der Konjugatbindung bis zu einer Konzentration von etwa 10 µg IgG/ml festgestellt werden. Erfolgte die Adsorption mit höheren Proteinkonzentrationen, nahm die Konjugatbindung allerdings wieder ab, ein Phänomen, das als "high dose hook effect" bekannt ist (RODBARD et al. 1978), und das mit einem verstärkten Ablösen gebundener Antikörper, die mit den verbliebenen wandständigen um die Konjugatmoleküle konkurrieren, erklärt wird.

Um im Sandwichverfahren (ELISA und LIA) eine möglichst maximale Konjugatbindung zu erzielen, wurde mit einer Konzentration von 8 µg anti-SEB-Schaf IgG/ml beschichtet.

Zur Standardisierung wurden Absättigung freier Bindungsstellen mit bovinem Serumalbumin, Inkubationszeiten von Toxin und Konjugat sowie Konjugatverdünnungen in beiden Testverfahren so abgestimmt, daß der Nachweis von 1 ng SEB/ml in möglichst kurzer Zeit geführt werden konnte.

Die von BRODBECK und GALLATI (1982) optimierte Bestimmung der Meerrettichperoxidase mit dem colorigenen Substrat o-Phenylendiamin in Verbindung mit H_2O_2 diente im ELISA zum Nachweis gebundener Enzymaktivität, während die zyklischen Diacylhydrazide im Lumineszenzverfahren mit dem Oxydationssystem nach SCHROEDER und YEAGER (1978) bei pH 8,6 bestimmt wurden. In Vorversuchen wurde zwar eine Verstärkung der Lichtemission bei pH 13,0 gegenüber einer Messung bei pH 8,6 erzielt, gleichzeitig ergab sich aber auch eine etwas geringere Nachweisempfindlichkeit des Testsystems. Vergleichende Untersuchungen mit dem Microperoxidase- H_2O_2 -System bei pH 8,6 und pH 13,0 führten auch WOOD et al. (1984) durch, ohne wesentliche Unterschiede im Lumineszenzverfahren feststellen zu können.

Bei Entwicklung serologischer Systeme zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen sollte zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse das Auftreten von Protein A-Interfe-

renzen ausgeschlossen werden. *Staphylococcus aureus* kann nämlich neben den Enterotoxinen und anderen Stoffwechselprodukten auch Protein A bilden, das wiederum zur Bindung an das Fc-Fragment der Immunglobulin G-Moleküle befähigt ist, wobei allerdings erhebliche Unterschiede in der Protein A-Bindungskapazität zwischen einzelnen Tierspezies und zum Teil auch zwischen verschiedenen Immunglobulinklassen einer Spezies bestehen können (LANGONE 1982). Während das zum Nachweis von Enterotoxinen wegen der Verwendung markierter - schwer zu produzierender und daher teurerer - Toxine weniger geeignete kompetitive Verfahren gegenüber Protein A unempfindlich ist, wird im nicht kompetitiven Sandwich-ELISA das Auftreten von Interferenzen durch Protein A beobachtet (NOTERMANS 1983; FEY et al. 1984). Daher wurde geprüft, wie stark Protein A bei Verwendung von Schaf IgG bzw. Kaninchen IgG den spezifischen Nachweis von SEB im Sandwich-ELISA beeinflussen kann.

So führten mit Kaninchen IgG beschichtete Platten bei gleichzeitiger Verwendung von Kaninchen IgG-Enzym-Konjugat zu deutlich positiven Reaktionen. Die geringere Affinität von Protein A zu ovinem IgG (GOUDWAARD et al. 1978; BENNELL und WATSON 1980) ermöglichte in Verbindung mit einem Kaninchen-IgG-Enzymkonjugat eine Verminderung der Bindung. Durch die sterische Hinderung der Protein A-Bindung an Schaf IgG-Enzym-Konjugat (NOTERMANS 1982) wurden schließlich falsch-positive Ergebnisse durch Protein A bei gleichzeitiger Verwendung einer Kaninchen IgG-Festkörperphase weitgehend verhindert bzw. mit einer Schaf IgG-Beschichtung vollständig eliminiert. Somit konnten die Ergebnisse von NOTERMANS et al. (1982) und FREED et al. (1982), die ebenfalls Protein A-Interferenzen im Sandwich-ELISA untersuchten, bestätigt werden.

Bei Beschichtung und Konjugatherstellung mit anti-SEB-Schaf IgG zeigte sich auch das lumineszenzimmunologische Verfahren gegenüber Protein A-Interferenzen beim Toxinnachweis unempfindlich. Ob neben der geringen Affinität von

Protein A zu Schaf IgG auch im LIA eine zusätzliche Verminderung der Protein A-Bindung durch die Kopplung von ABEI-H Molekülen an das Immunglobulin G gegeben ist, wurde in den Versuchen nicht geklärt, ist aber in Analogie zu den Ergebnissen im enzymimmunologischen Verfahren wahrscheinlich.

Mit den Untersuchungen zur Protein A-Bindung im immunologischen Verfahren wird nochmals die Bedeutung des Versuchstieres Schaf zur Gewinnung diagnostischer Antisera, die dem Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen dienen sollen, hervorgehoben.

In orientierenden Versuchen wurden die beiden Verfahren auf ihre praktische Anwendbarkeit zum Enterotoxinnachweis aus künstlich kontaminierten Lebensmitteln getestet, wobei zur Erzielung adäquaterer Standardkurven Toxin-Standardverdünungen mit Extrakten des jeweils zu untersuchenden Lebensmittels angelegt wurden.

Beide Nachweisverfahren ermöglichten bei Zusatz von 0,1 µg SEB zu 100 g bzw. 100 ml eines Lebensmittels in jedem Fall eine rasche Wiederfindung des Toxins und genügten damit den Anforderungen an ein geeignetes Verfahren zum Enterotoxinnachweis aus Lebensmitteln. Mit der zur raschen Bestimmung erforderlichen einfachen Aufarbeitung der Lebensmittel gelang die Eliminierung von Störfaktoren aus dem Untersuchungsmaterial bei vertretbar geringem Toxinverlust, wobei im Vergleich zu NOTERMANS (1983) relativ hohe Mengen an zugesetztem Toxin wiedergefunden werden konnten.

Die Abweichungen der Wiederfindungsraten sind weniger auf die Nachweisverfahren selbst als auf unterschiedliche Verluste des hochgereinigten instabilen Toxins während der Extraktion bei den einzelnen Lebensmitteln und auf die manuelle graphische Ermittlung der Toxingehalte zurückzuführen. Mit einem entsprechenden Programm bei Datenverarbeitung der Meßwerte kann die letztgenannte Fehlerquelle weitgehend ausgeschaltet werden.

Trotz Abweichungen an wiedergefundenem Toxin mittels LIA und ELISA konnten im Vergleich zu den Untersuchungen von FREED et al. (1982), die das enzymimmunologische Verfahren mit dem radioimmunologischen bei Anwendung ähnlicher Extraktionsverfahren verglichen, gute Resultate erzielt werden.

Insgesamt konnte mit dem LIA ein gegenüber dem ELISA stark vereinfachtes Analyseverfahren zur extrem schnellen Bestimmung (30 min nach Absättigung der Polystyrenröhrchen) von SEB aus künstlich kontaminierten Lebensmitteln entwickelt und geprüft werden. Die Durchführung des ohnehin schon schnellen enzymimmunologischen Verfahrens benötigte hingegen nach erfolgter Absättigung der Microtiterplatten den dreifachen Zeitaufwand (90 min). Die in beiden Verfahren nachgewiesenen Toxinmengen liegen zudem über der von REISER et al. (1974) geforderten Nachweisgrenze zur Aufklärung von Lebensmittelvergiftungen.

Mit den Untersuchungen sind die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen worden, den LIA auch zum Nachweis der anderen Toxintypen auszubauen, womit in der Lebensmitteluntersuchung eine rasche, einfache und zuverlässige Enterotoxin-diagnostik zur Verfügung stünde. Wegen der geringen Verfügbarkeit insbesondere der Referenztoxine D und E wird die Untersuchung mit einem Zwei-Stufen-Verfahren empfohlen. In der ersten Beurteilungsstufe könnten positive Proben und der beteiligte Toxintyp ermittelt werden, während in der zweiten Stufe durch Anlegen einer Standardkurve die Menge des Toxins bestimmt werden könnte. Gegenwärtig stehen bereits Lumino-meter zur Verfügung, die zudem bei erhöhter Bedienungsneutralität und geringerem Arbeitsaufwand eine weitere Beschleunigung des Verfahrens gestatten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) mittels ELISA und LIA mußte nach Gewinnung diagnostischer Antisera anti-SEB-Schaf IgG isoliert und mit einem Enzym bzw. einer luminogenen Substanz markiert werden.

Hierzu wurden toxinsparend Schafe mit SEB immunisiert und anti-SEB-Schaf IgG mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M aus dem Serum isoliert.

Zur Enzymmarkierung wurde Meerrettichperoxidase an anti-SEB-Schaf IgG gekoppelt. Enzymaktivitäten wurden mit o-Phenylen-diamin als Substrat bestimmt. Als Immunosorbens dienten im ELISA mit anti-SEB-Schaf IgG beschichtete Microtiterplatten.

Das luminogene N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminolhemisuccinamid (ABEI-H) wurde nach Aktivierung durch Veresterung an anti-SEB-Schaf IgG gekoppelt und das optimale molare Kopplungsverhältnis der beiden Reaktionspartner erarbeitet. Zur Herstellung eines Immunosorbens für den LIA wurden Polystyrenröhrchen mit IgG beschichtet. Lumineszenzmessungen erfolgten mit dem Microperoxidase- H_2O_2 -Oxidationssystem bei pH 8,6.

Nach Standardisierung der Verfahren lag die Nachweisgrenze für SEB in Standardlösungen im LIA bei 0,40 ng/ml und im ELISA bei 0,15 ng/ml. Durch Verwendung von Schaf IgG für Beschichtung und Konjugatherstellung wurde, im Gegensatz zu Kaninchen IgG, in beiden Verfahren das Auftreten von Protein A-Interferenzen vermieden.

In orientierenden Versuchen wurde der Nachweis von SEB aus künstlich kontaminierten Lebensmitteln vergleichend mittels

LIA und ELISA geführt. Mit beiden Verfahren war bei Anwendung einfacher und zeitsparender Extraktionsmethoden der zur Aufklärung von Lebensmittelvergiftungen geforderte Toxinnachweis von 0,1 µg SEB/100 g bzw. 100 ml Lebensmittel in kurzer Zeit möglich. Der LIA war dem ELISA bei vergleichbarer Nachweisempfindlichkeit und befriedigender Wiederfindung an zugesetztem Toxin hinsichtlich Bestimmungsdauer (LIA: 30 min, ELISA: 90 min) und einfacher Durchführbarkeit überlegen.

SUMMARY COMPARISON OF A LUMINESCENCE IMMUNOASSAY (LIA)
AND AN ENZYME IMMUNOASSAY (ELISA) FOR DETECTION
OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B

After preparing specific antisera isolated anti-SEB sheep IgG had to be coupled with an enzyme and a luminescent compound respectively for detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) by LIA and ELISA.

Sheep were immunized with small amounts of SEB. Anti-SEB sheep IgG was isolated by DEAE-Trisacryl M ion exchange chromatography. For enzyme marking horseradish peroxidase was coupled to anti-SEB sheep IgG and the activities of the enzyme were measured with o-phenyldiamine as substrate. ELISA was performed with anti-SEB sheep IgG coated microtiterplates as immunosorbent.

After active ester formation the luminescent N-(4-amino-butyl)-N-ethyl isoluminol hemisuccinamide (ABEI-H) was coupled to anti-SEB sheep IgG and the optimal molar ratio label: IgG was estimated. LIA was performed with IgG coated polystyrene tubes as immunosorbent. Luminescence was measured with the microperoxidase- H_2O_2 oxidation system at pH 8.6.

After standardisation of the procedures the detection limit for SEB in standard samples was 0.40 ng/ml for the LIA and 0.15 ng/ml for the ELISA. Using sheep IgG for coating and synthesis of conjugates protein A interferences were avoided in both assays in contrast to rabbit IgG.

Foods with known amounts of added SEB were analyzed comparing LIA with ELISA. Using simple and fast extractions it was possible to detect the amount of 0.1 μ g SEB/100 g or 100 ml of food respectively required for the detection of food poisoning outbreaks in a short time with both assays. At comparable sensitivity the LIA proved to be the faster (LIA: 30 min, ELISA: 90 min) and simpler method with a satisfactory recovery of added toxin.

6 LITERATUR

ABRAHAM, G.E. (1974):

Radioimmunoassay of steroids in biological materials

Acta Endocrin. Suppl. 183, 5-42

AHNSTRÖM, G. und R. NILSSON (1965):

Activation of chemiluminescent oxidations catalyzed by peroxidase and the differentiation of peroxidase agents

Acta Chem. Scand. 19, 313-316

AIZAWA, M., S. SUZUKI, T. KATO, T. FUJIWARA und Y. FUJITA (1980):

Solid-phase luminescent enzyme immunoassay of IgG and anti-IgG using a transparent and nonporous antibody-bound plate

J. Appl. Biochem. 2, 190-195

ARAKAWA, H., M. MAEDA und A. TSUJI (1979):

Chemiluminescence enzyme immunoassay of cortisol using peroxidase as label

Anal. Biochem. 97, 248-254

ARAKAWA, H., M. MAEDA und A. TSUJI (1982):

Chemiluminescence enzyme immunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone using glucose oxidase and bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate - fluorescent dye system

Chem. Pharm. Bull. 30, 3036-3039

ARAKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI und A. KAMBEGAWA (1981):

Chemiluminescence enzyme immunoassay of dehydroepiandrosterone and its sulfate using peroxidase as label

Steroids 38, 453-464

AUSES, J.P., S.L. COOK und J.T. MALOY (1975):
Chemiluminescent enzyme method for glucose
Anal. Chem. 47, 244-249

AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1971):
Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with
enhanced intracellular penetration
Immunochemistry 8, 1175-1179

AXÉN, R., J. PORATH und S. ERNBÄCK (1967):
Chemical coupling of peptides and proteins to poly-
saccharides by means of cyanogen halides
Nature 214, 1302-1304

BARNARD, G., W.P. COLLINS, F. KOHEN und H.R. LINDNER (1981):
A preliminary study of the measurement of urinary pregn-
enediol-3 α -glucuronide by a solid-phase chemiluminescence
immunoassay
in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and
chemiluminescence, p. 311-317
Academic Press New York

BARNARD, G.J., J.B. KIM, J.L. BROCKELBANK, W.P. COLLINS,
B. GAIER und F. KOHEN (1984):
Measurement of choriogonadotropin by chemiluminescence
immunoassay and immunochemiluminometric assay: 1. Use of
isoluminol derivatives
Clin. Chem. 30, 538-541

BENNEL, M.A. und D.L. WATSON (1980):
The interactions of porcine and ovine, serum and colostral
immunoglobulins with staphylococcal protein A
Microbiol. Immunol. 24, 871-878

BERGDOLL, M.S. (1970):

Enterotoxins

In: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL:

Microbial toxins, Vol. 3, p. 265-326

Academic Press New York

BITLER, B. und W.D. MC ELROY (1957):

The preparation and properties of crystalline firefly luciferin

Arch. Biochem. Biophys. 72, 358-368

BÖHM, R. und M. ZSCHÖCK (1984):

The chemiluminescent - enzyme - immuno - assay (CEIA) as a rapid method in diagnostic bacteriology

Abstracts of the fourth international symposium on rapid methods and automation in microbiology and immunology

6. - 9. Juni, 1984, Berlin

BOLTON, A.E. und W.M. HUNTER (1973):

The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent.

Application to the radioimmunoassay

Biochem. J. 133, 529-539

BOSTICK, D.T. und D.M. HERCULES (1975):

Quantitative determination of blood glucose using enzyme induced chemiluminescence of luminol

Anal. Chem. 47, 447-452

BOTTI, R., P. LEONCINI, P. NERI und P. TARLI (1981):

Chemiluminescence enzyme-immunoassay of human chorionic somatomammotropin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 623

BROCKELBANK, J.L., J.B. KIM, G.J. BARNARD, W.P. COLLINS, B. GAIER und F. KOHEN (1984):

The measurement of urinary LH by a solid-phase chemiluminescence immunoassay

Ann. Clin. Biochem. 21, 284-289

BRUNDRETT, R.B., D.F. ROSWELL und E.H. WHITE (1972):

Yields of chemically produced excited states

J. Amer. Chem. Soc. 94, 7536-7541

BRUNDRETT, R.B. und E.H. WHITE (1974):

Synthesis and chemiluminescence of derivatives of luminol and isoluminol

J. Amer. Chem. Soc. 96, 7497-7502

CATT, K.J. und G.W. TREGGAR (1967):

Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes
Science 158, 1570-1572

CARRICO, R.J., K.-K. YEUNG, H.R. SCHROEDER, R.C. BOGUS-LASKI, R.T. BUCKLER und J.E. CHRISTNER (1976):

Specific protein-binding reactions monitored with ligand-ATP conjugates and firefly luciferase

Anal. Biochem. 76, 95-110

CHENG, P.-J., I. HEMMILÄ und T. LÖVGREN (1982):

Development of solid-phase immunoassay using chemiluminescent IgG conjugates

J. Immunol. Methods 48, 159-168

CLINE, T.W. und J.W. HASTINGS (1972):

Mutationally altered bacterial luciferase. Implications for subunit functions

Biochem. 11, 3359-3370

CORMIER, M.J. und P.M. PRICHARD (1968):

An investigation of the mechanism of the luminescent per-

oxidation of luminol by stopped flow techniques

J. Biol. Chem. 243, 4706-4714

CORTHIER, G., E. BOSCHETTI und J. CHARLEY-POULAIN (1984):
Improved method for IgG purification from various animal
species by ion exchange chromatography

J. Immunol. Methods 60, 75-79

DAVIES, G.E. und G.D. STARK (1970):

Use of dimethyl suberimide, a cross-linking reagent in
studying the subunit of oligomeric proteins

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 651-656

DE BOEVER, J., F. KOHEN und D. VANDEKERCKHOVE (1983):

Solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma
estradiol-17 β during gonadotropin therapy compared with
two radioimmunoassays

Clin. Chem. 29, 2068-2072

DE LUCA, M.A. (1978):

Methods in enzymology, Vol. 57

Academic Press New York

DE LUCA und MC ELROY (1978):

Purification and properties of firefly luciferase
in: DE LUCA, M.A.: Methods in enzymology, Vol. 57,
p. 3-15

Academic Press New York

DE LUCA, M. und M. MARSH (1967):

Conformational changes of luciferase during catalyses.
Tritium-hydrogen exchange and optical rotation studies

Arch. Biochem. Biophys. 121, 233-240

DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY (1981):

Bioluminescence and chemiluminescence

Academic Press New York

DE LUCA, M., G.W. WIRTZ und W.D. MC ELROY (1964):
Role of sulphhydryl groups in firefly luciferase
Biochem. 7, 935-939

EKINS, R. (1980):
More sensitive immunoassays
Nature 284, 14-15

ENDE, I.A., G. TERPLAN, B. KICKHÖFEN und D.K. HAMMER (1983):
Chromatofocusing: A new method for purification of
staphylococcal enterotoxins B and C₁
Appl. Environ. Microbiol. 46, 1323-1330

ENGVAL, E. (1980):
Enzyme immunoassay ELISA and EMIT
in: VUNAKIS, H.V. und J.J. LANGONE: Methods in enzymology,
Vol. 70(A), p. 419-439
Academic Press New York

ESHAR, Z., J.B. KIM, G. BARNARD, W.P. COLLINS, S. GILAD,
H.R. LINDNER und F. KOHEN (1981):
Use of monoclonal antibodies to pregnanediol-3 α -glucuronide
for the development of a solid phase chemiluminescence
immunoassay
Steroids 38, 89-109

EWETZ, L. und A. THORE (1976):
Factors affecting the specificity of the luminol reaction
with hematin compounds
Anal. Biochem. 71, 564-570

FEY, H., H. PFISTER und O. RÜEGG (1984):
Comparative evaluation of different enzyme-linked immuno-
sorbent assay systems for the detection of staphylococcal
enterotoxins A, B, C, and D
J. Clin. Microbiol. 19, 34-38

FLEMING, G.R., A.W.E. KNIGHT, J.M. MORRIS, R.J.S. MORRISON
und G.W. ROBINSON (1977):

Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes
J. Amer. Chem. Soc. 99, 4306-4311

FRICKE, H., C.J. STRASBURGER und W.G. WOOD (1982):
Enzyme enhanced luminescence immunoassay for the determi-
nation of transferrin concentrations in serum
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 91-94

FRIEDLAND, J. und J.W. HASTINGS (1967):
Nonidentical subunits of bacterial luciferase: Their iso-
lation and recombination to form active enzyme
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 2336-2342

GADOW, A., H. FRICKE, C.J. STRASBURGER und W.G. WOOD (1984):
Synthesis and evaluation of luminescent tracers and haptен-
protein conjugates for use in luminescence immunoassays
with immobilised antibodies and antigens.
A critical study of macro solid phases for use in immuno-
assay systems, part II
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 337-347

GALLATI, H. und H. BRODBECK (1982):
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimie-
rung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und
o-Phenylendiamin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 221-225

GORUS, F. und E. SCHRAM (1979):
Applications of bio- and chemiluminescence in the clinical
laboratory
Clin. Chem. 25, 512-519

GOUDSWAARD, I., I.A. VAN DER DONK, A. NOORDZIJ, R.H. VAN
DAM und J.-P. VAERMAN (1978):

Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins
Scand. J. Immunol. 8, 21-28

GRABAR, P. und C.A. WILLIAMS (1953):
Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électro-
phoretiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Application au serum sanguin
Biochim. Biophys. Acta 10, 193-194

GREEN, A.A. und W. D. MC ELROY (1956):
Crystalline firefly luciferase
Biochim. Biophys. Acta 20, 170-176

GUNDERMANN, K.-D. (1974):
Recent advances in research on the chemiluminescence of
organic compounds
Top. Curr. Chem. 46, 61-139

GUNDERMANN, K.-D. und M. DRAWERT (1962):
Sterische Resonanzhinderung bei alkylierten Aminophthal-
hydraziden
Chem. Ber. 95, 2018-2026

GUNSALUS-MIGUEL, A., E.A. MEIGHEN, M.Z. NICOLI, K.H. NEALSON
und J.W. HASTINGS (1972):
Purification and properties of bacterial luciferase
J. Biol. Chem. 247, 389-404

HALES, C.N. und J.S. WOODHEAD (1980):
Labeled antibodies and their use in the immunoradiometric
assay
in: VUNAKIS, H.V. und J.J. LANGONE: Methods in enzymology,
Vol. 70(A), p. 334-355
Academic Press New York

HASTINGS, J.W. und K.H. NEALSON (1977):

Bacterial bioluminescence

Annu. Rev. Microbiol. 31, 549-595

HASTINGS, J.W., S. GHISLA, M. KURFÜRST, P. HEMMERICH (1981):

Fluorescence properties of luciferase peroxyflavins prepared with iso-FMN and 2-thio FMN

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY:

Bioluminescence and chemiluminescence, p. 97-112

Academic Press New York

HENRY, J.P., M.F. ISAMBERT und A.M. MICHELSON (1969):

Studies in bioluminescence

III. The Pholas dactylus system

Biochim. Biophys. Acta 205, 437-450

DIESELBEN (1973):

Studies in bioluminescence

IX. Mechanism of the Pholas dactylus system

Biochim. 55, 83-93

HERRMANN, J.E. (1980):

Quantitation of antibodies immobilized on plastics

in: VUNAKIS, H.V. und J.J. LANGONE:

Methods in enzymology, Vol. 70(A), p. 239-244

Academic Press New York

HERSH, L.S., W.P. VANN und S.A. WILHELM (1979):

A luminol-assisted, competitive-binding immunoassay of human immunoglobulin G

Anal. Biochem. 93, 267-271

IKARIYAMA, Y., S. SUZUKI und M. AIZAWA (1982):

Luminescence immunoassay of human serum albumin with hemin as labeling catalyst

Anal. Chem. 54, 1126-1129

DIESELBEN (1983):

Luminescence catalyst immunoassay of β_2 -microglobulin with haemin as a chemically amplifiable label

Enzyme Microb. Technol. 5, 215-218

ISACSSON, U. und G. WETTERMARK (1974):

Chemiluminescence in analytical chemistry

Anal. Chim. Acta 68, 339-362

JABLONSKI, E. und M. DE LUCA (1979):

Properties and uses of immobilized light-emitting enzyme systems from *Beneckea harveyi*

Clin. Chem. 25, 1622-1627

JONES, P. und V. KUMAR (1984):

A solid-phase chemiluminescence immunoassay for determination of IgG in eluates of psoriatic scales

J. Immunol. Methods 70, 185-192

KEMP, H.A., J.S.A. SIMPSON und J.S. WOODHEAD (1981):

Automated two-site immunoradiometric assay of human alpha-fetoprotein in maternal serum

Clin. Chem. 27, 1388-1391

KIM, J.B., G.J. BARNARD, W.P. COLLINS, F. KOHEN, H.R.

LINDNER und Z. ESHHAR (1982):

Measurement of plasma estradiol-17 β by solid-phase chemiluminescence immunoassay

Clin. Chem. 28, 1120-1124

KITAGAWA, T. und T. AIKAWA (1976):

Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent

J. Biochem. 79, 233-236

KLINGLER, W. und G. VON POSTEL (1982):

Entwicklung von zwei Chemilumineszenz-Immunoassays zur Bestimmung des freien Östriols im Serum von Schwangeren

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 679

KOHEN, F., J.B. KIM, G. BARNARD und H.R. LINDNER (1980a):

An assay for urinary estriol-16 α -glucuronide based on antibody-enhanced chemiluminescence

Steroids 36, 405-419

KOHEN, F., J.B. Kim, H.R. LINDNER und G. BARNARD (1981):

An immunoassay for urinary estriol-16 α -glucuronide based on antibody-enhanced chemiluminescence

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and chemiluminescence, p. 351-356

Academic Press New York

KOHEN, F., H.R. LINDNER und S. GILAD (1983):

Development of chemiluminescence monitored immunoassays for steroid hormones

J. steroid Biochem. 19, 413-418

KOHEN, F., M. PAZZAGLI, J.B. KIM und H.R. LINDNER (1980b):

An immunoassay for plasma cortisol based on chemiluminescence

Steroids 36, 421-437

KOHEN, F., M. PAZZAGLI, J.B. KIM, H.R. LINDNER und

R.C. BOGUSLASKI (1979):

An assay procedure for plasma progesterone based on antibody-enhanced chemiluminescence

FEBS Lett. 104, 201-205

KONISHI, E., S. IWASA, K. KONDO und M. HORI (1980):

Chemiluminescence-linked immunoassay for detection of mumps

virus antibodies

J. Clin. Microbiol. 12, 140-143

KOO, J.-Y., S.P. SCHMIDT und G.B. SCHUSTER (1978):

Bioluminescence of the firefly: Key steps in the formation of the electronically excited state for model systems

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 30-33

KOO, J.-Y. und G.B. SCHUSTER (1978):

Chemiluminescence of diphenoyl peroxide. Chemically initiated electron exchange luminescence. A new general mechanism for chemical production of electronically excited states

J. Amer. Chem. Soc. 100, 4496-4503

LANGONE, J.J. (1982):

Protein A of staphylococcus aureus und related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci in: DIXON, F.J. und H.G. KUNKEL: Advances in immunology, Vol. 32, p. 157-252

Academic Press New York

LINDSTRÖM, L., L. MEURLING und T. LÖVGREN (1982):

The measurement of serum cortisol by a solid-phase chemiluminescence immunoassay

J. steroid Biochem. 16, 577-580

LINZ, GÜNTHER (1983):

Untersuchungen zur Rationalisierung enzymimmunologischer Nachweise von Staphylokokken-Enterotoxinen am Beispiel des Typ B

Diss. med. vet. München

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

MC CAPRA, F. (1973):

Die Chemie der Biolumineszenz

Endeavour 32, 139-145

DERSELBE (1976):

Chemical mechanisms in bioluminescence

Acc. Chem. Res. 9, 201-208

MC ELROY, W.D. und M. DE LUCA (1981):

The chemistry and applications of firefly luminescence

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and chemiluminescence, p. 179-186

Academic Press New York

DIESELBEN (1983):

Firefly and bacterial luminescence: Basic science and applications

J. Appl. Biochem. 5, 197-209

MEIGHEN, E.A., M.Z. NICOLI und J.W. HASTINGS (1971a):

Hybridization of bacterial luciferase with a variant produced by chemical modification

Biochem. 10, 4062-4068

DIESELBEN (1971b):

Functional differences of the nonidentical subunits of bacterial luciferase. Properties of hybrids of native and chemically modified bacterial luciferase

Biochem. 10, 4069-4073

MESSERI, G., A.L. CALDINI, G.F. BOLELLI, M. PAZZAGLI,

A. TOMMASI, P.L. VANNUCCHI und M. SERIO (1984):

Homogeneous luminescence immunoassay for total estragens

in urine

Clin. Chem. 30, 653-657

MEYER, R.F., L. MILLER, R.W. BENNET und J.D. MACMILLAN
(1984):

Development of a monoclonal antibody capable of inter-
acting with five serotypes of Staphylococcus aureus
enterotoxin

Appl. Environ. Microbiol. 47, 283-287

MICHELSON, A.M. (1978):

Purification and properties of Pholas dactylus luciferin
and luciferase

in: DE LUCA, M.A.: Methods in enzymology, Vol. 57,
p. 385-406

Academic Press New York

MILLER, B.A., R.F. REISER und M.S. BERGDOLL (1978):

Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E
in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells
containing protein A as immunoadsorbent

Appl. Environ. Microbiol. 36, 421-426

MILLER, R.J. und D.W. REICHARD (1981):

Chemiluminescent immunoassay for the detection of virus/
antibody aggregates

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and
chemiluminescence, p. 645-649

Academic Press New York

NAKAMURA, T. (1972):

Standardization of an aqueous light source containing
luminol: Application to measurement of quantum yields of
bioluminescent reactions

J. Biochem. 72, 173-177

NAKANE, P.K. und A. KAWAOI (1974):

Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation
J. Histochem. Cytochem. 22, 1084-1091

NEALSON, K.H. und J.W. HASTINGS (1979):

Bacterial bioluminescence: Its control and ecological
significance

Microbiol. Rev. 43, 496-518

NEUFELD, H.A., C.J. CONKLIN und R.D. TOWNER (1965):

Chemiluminescence of luminol in the presence of hematin
compounds

Anal. Biochem. 12, 303-309

NILSSON, R. (1964):

On the mechanism of peroxidase catalyzed oxidations studied
by means of chemiluminescence measurements

Acta Chem. Scand. 18, 389-401

NOTERMANS, S. (1982):

Persönliche Mitteilung

NOTERMANS, S. (1983):

Nachweis von Staphylokokkus-Enterotoxinen in Lebensmitteln
mittels ELISA-Test

Dtsch. Lebensmittel Rdsch. 79, 156-159

NOTERMANN, S., P. TIMMERMANS und J. NAGEL (1982):

Interaction of staphylococcal protein A in enzyme-linked
immunosorbent assays for detecting staphylococcal antigens

J. Immunol. Meth. 55, 35-41

OLSSON, T., G. BRUNIUS, H.E. CARLSSON und A. THORE (1979):

Luminescence immunoassay (LIA): A solid-phase immunoassay
monitored by chemiluminescence

J. Immunol. Methods 25, 127-135

O'SULLIVAN, M.J., E. GNEMMI, D. MORRIS, G. CHIEREGATTI,
M. SIMMONS, A.D. SIMMONS, J.W. BRIDGES und V. MARKS (1978):
A simple method for the preparation of enzyme-antibody
conjugates

FEBS Lett. 95, 311-313

DIESELBEN (1979):

Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody con-
jugates: Application of these conjugates for enzyme immuno-
assay

Anal. Biochem. 100, 100-108

PATEL, A. und A.K. CAMPBELL (1983):

Homogeneous immunoassay based on chemiluminescence energy
transfer

Clin. Chem. 29, 1604-1608

PATEL, A., C.J. DAVIES, A.K. CAMPBELL und F. MC CAPRA
(1983):

Chemiluminescence energy transfer: A new technique appli-
cable to the study of ligand-ligand interactions in living
systems

Anal. Biochem. 129, 162-169

PATEL, A., M.S. MORTON, J.S. WOODHEAD, M.E.T. RYALL,
F. MC CAPRA und A.K. CAMPBELL (1982):

A new chemiluminescent label for use in immunoassay

Biochem. Soc. Trans. 10, 224-225

PAZZAGLI, M., F. KOHEN, J.B. KIM und H.R. LINDNER (1981c):
An immunoassay for plasma cortisol based on chemilumines-
cence

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and
chemiluminescence, p. 651-656

Academic Press New York

PAZZAGLI, M., J.B. KIM, G. MESSERI, F. KOHEN, G.F. BOLELLI, A. TOMMASI, R. SALERNO, G. MONETI und M. SERIO (1981a): Luminescent immunoassay (LIA) of cortisol 1. Synthesis and evaluation of two chemiluminescent labels of cortisol
J. steroid Biochem. 14, 1005-1012

PAZZAGLI, M., J.B. KIM, G. MESSERI, F. KOHEN, G.F. BOLELLI, A. TOMMASI, R. SALERNO und M. SERIO (1981b): Luminescent immunoassay (LIA) of cortisol 2. Development and validation of the immunoassay monitored by chemiluminescence
J. steroid Biochem. 14, 1181-1187

PAZZAGLI, M., J.B. KIM, G. MESSERI, G. MARTINAZZO, F. KOHEN, F. FRANCESCHETTI, G. MONETI, R. SALERNO, A. TOMMASI und M. SERIO (1981d): Evaluation of different progesterone-isoluminol conjugates for chemiluminescence immunoassay
Clin. Chim. Acta 115, 277-286

PAZZAGLI, M., J.B. KIM, G. MESSERI, G. MARTINAZZO, F. KOHEN, F. FRANCESCHETTI, A. TOMMASI, R. SALERNO und M. SERIO (1981e): Luminescent immunoassay (LIA) for progesterone in a heterogeneous system
Clin. Chim. Acta 115, 287-296

PAZZAGLI, M., G. MESSERI, A.L. CALDINI, G. MONETI, G. MARTINAZZO und M. SERIO (1983): Preparation and evaluation of steroid chemiluminescent tracers
J. steroid Biochem. 19, 407-412

PETERSON, K., H. SIITARI, I. HEMMILÄ, E. SOINI, T. LÖVGREN, V. HÄNNINEN, P. TANNER und U.-H. STENMANN (1983):

Time-resolved fluoroimmunoassay of human choriogonadotropin
Clin. Chem. 29, 60-64

PRATT, J.J., M.G. WOLDRING und L. VILLERIUS (1978):
Chemiluminescence-linked immunoassay
J. Immunol. Methods 21, 179-184

PRICHARD, P.M. und M.J. CORMIER (1968):
Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase
catalyzed luminescent peroxidation of luminol
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 131-136

PRONOVOST, A.D., A. BAUMGARTEN und G.D. HSIUNG (1981):
Sensitive chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent
assay for quantification of human immunoglobulin G and de-
tection of herpes simplex virus
J. Clin. Microbiol. 13, 97-101

PRONOVOST, A.D., A. BAUMGARTEN und W.A. ANDIMAN (1982):
Chemiluminescent immunoenzymatic assay for rapid diagnosis
of viral infections
J. Clin. Microbiol. 16, 345-349

PUGET, K., A.M. MICHELSON und S. AVRAMEAS (1977):
Light emission techniques for the microestimation of
femtogram levels of peroxidase
Anal. Biochem. 79, 447-456

RADDA, G.K. (1975):
Fluorescent probes in membrane studies
in: KORN, E.D.: Methods in membrane biology, Vol., 4,
p. 97-188
Plenum Press New York

RAPAPORTE, E., M.W. CASS und E.H. WHITE (1972):

Chemiluminescence of linear hydrazides

J. Amer. Chem. Soc. 94, 3153-3159

RAUHUT, M.M., L.J. BOLLYKY, B.G. ROBERTS, M. LOY, R.H.
WHITMAN, A.V. IANNOTTA, A.M. SEMSEL und R.A. CLARKE (1967):
Chemiluminescence from reactions of electronegatively substituted aryl oxalates with hydrogen peroxide and fluorescent compounds

J. Amer. Chem. Soc. 89, 6515-6522

REICHARD, D.W. und R.J. MILLER (1981):
Bioluminescent immunoassay: A new enzyme-linked analytical method for the quantitation of antigens
in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and chemiluminescence, p. 667-672
Academic Press New York

REISER, R., D. CONAWAY und M.S. BERGDOLL (1974):
Detection of staphylococcal enterotoxin in foods
Appl. Microb. 27, 83-85

ROSWELL, D.F. und E.H. WHITE (1978):
The chemiluminescence of luminol and related hydrazides
in: DE LUCA, M.A.: Methods in enzymology, Vol. 57,
p. 409-423
Academic Press New York

SCHROEDER, H.R., R.J. CARRICO, R.C. BOGUSLASKI und J.E. CHRISTNER (1976a):
Specific binding reactions monitored with ligand-cofactor conjugates and bacterial luciferase
Anal. Biochem. 72, 283-292

SCHROEDER, H.R., R.C. BOGUSLASKI, R.J. CARRICO und R.T. BUCKLER (1978):

Monitoring specific protein-binding reactions with chemiluminescence

in: DE LUCA, M.A.: Methods in enzymology, Vol. 57, p. 424-445

Academic Press New York

SCHROEDER, H.R., C.M. HINES, D.D. OSBORN, R.P. MOORE, R.L. HURTLE, F.F. WOGOMANN, R.W. ROGERS und D.O. VOGELHUT (1981a):

Immunochemiluminometric assay for hepatitis B surface antigen

Clin. Chem. 27, 1378-1384

SCHROEDER, H.R., C.M. HINES und P.O. VOGELHUT (1981b):

Chemiluminescence immunoassay for anti-human-IgG

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and chemiluminescence, p. 55-62

Academic Press New York

SCHROEDER, H.R. und F.M. YEAGER (1978):

Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems

Anal. Chem. 50, 1114-1120

SCHROEDER, H.R., F.M. YEAGER, R.C. BOGUSLASKI, E.O. SNOKE und R.T. BUCKLER (1977):

Immunoassay for thyroxine monitored by chemiluminescence

Clin. Chem. 23, 1132

SCHROEDER, H.R., F.M. YEAGER, R.C. BOGUSLASKI und

P.O. VOGELHUT (1979):

Immunoassay for serum thyroxine monitored by chemiluminescence

J. Immunol. Methods 25, 275-282

SCHROEDER, H.R., P.O. VOGELHUT, R.J. CARRICO, R.C. BOGUS-LASKI und R.T. BUCKLER (1976b):

Competitive protein binding assay for biotin monitored by chemiluminescence

Anal. Chem. 48, 1933-1937

SCHUURS, A.H.W.M. und B.K. VAN WEEMEN (1977):

Enzyme immunoassay

Clin. Chim. Acta 81, 1-40

SEITZ, W.R. und M.P. NEARY (1974):

Chemiluminescence and bioluminescence in chemical analysis

Anal. Chem. 46, 188 A - 202 A

SELIGER, H.H. und R.A. MORTON (1968):

A physical approach to bioluminescence

in: GIESE, A.C.: Photophysiology, Vol. IV, p. 253-314

Academic Press New York

SHAPIRO, R., J. CHAN, A. PEIRSON, K. VACCARO und

J. QUICK (1984):

Protein-enhanced fluorescein chemiluminescence used in an immunoassay for rubella antibody in serum

Clin. Chem. 30, 889-893

SIMON, E. und G. TERPLAN (1977):

Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B mittels ELISA-Test

Zbl. Vet. Med. B 24, 842-844

SIMPSON, J.S.A., A.K. CAMPBELL, M.E.T. RYALL und J.S.

WOODHEAD (1979):

A stable chemiluminescent-labelled antibody for immunological assays

Nature 279, 646-647

SIMPSON, J.S.A., A.K. CAMPBELL, J.S. WOODHEAD, A. RICHARDSON, R. HART und F. MC CAPRA (1981):

Chemiluminescent labels in immunoassay

in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and chemiluminescence, p. 673-679

Academic Press New York

SOINI, E. und I. HEMMILÄ (1979):

Fluoroimmunoassay: Present status and key problems

Clin. Chem. 25, 535-561

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137

STRASBURGER, C.J., H. FRICKE und W.G. WOOD (1982):

Development and optimisation of a chemiluminescent immunoassay (CLIA) for serum and urinary cortisol

Fresenius Z. Anal. Chem. 311, 351-352

STREHLER, B.L. und W.D. MC ELROY (1957):

Assay of adenosine triphosphate

in: COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN: Methods in enzymology, Vol. 3, p. 871-873

Academic Press New York

ULLMANN, E.F., M. SCHWARZBERG und K.E. RUBENSTEIN (1976):

Fluorescent transfer immunoassay. A general method for the determination of antigens

J. Biol. Chem. 251, 4172-4178

VANNUCCHI, P.L., G. MESSERI, G.F. BOLELLI, M. PAZZAGLI, A. MALASA und M. SERIO (1983):

A solid phase chemiluminescent immunoassay (LIA) for testosterone glucuronide in diluted urines

J. steroid Biochem. 18, 625-629

VAN WEEMEN, B.K. und A.H.W.M. SCHUURS (1971):
Immunoassay using antibody-enzyme conjugates
FEBS Lett. 24, 77-82

VELAN, B. und M. HALMANN (1978):
Chemiluminescence immunoassay: A new sensitive method for
determination of antigens
Immunochemistry 15, 331-333

WANNLUND, J. und M. DE LUCA (1981):
Bioluminescent immunoassays: Use of luciferase-antigen con-
jugates for determination of methotrexate and DNP
in: DE LUCA, M.A. und W.D. MC ELROY: Bioluminescence and
chemiluminescence, p. 693-696
Academic Press New York

WANNLUND, J. und M. DE LUCA (1982):
A sensitive bioluminescent immunoassay for dinitrophenol
and trinitrotoluene
Anal. Biochem. 122, 385-399

WEEKS, I., I. BEHESHTI, F. MC CAPRA, A.K. CAMPBELL und
J.S. WOODHEAD (1983a):
Acridinium esters as high-specific-activity labels in
immunoassay
Clin. Chem. 29, 1474-1479

WEEKS, I., A.K. CAMPBELL und J.S. WOODHEAD (1983b):
Two-site immunochemiluminometric assay for human α_1 -feto-
protein
Clin. Chem. 29, 1480-1483

WEERASEKERA, D.A., J.B. KIM, G.J. BARNARD und W.P. COLLINS
(1983):
Measurement of serum thyroxine by solid-phase chemilumines-

cence immunoassay

Ann. Clin. Biochem. 20, 100-104

WEERASEKERA, D.A., J.B. KIM, G.J. BARANRD, W. COLLINS,
F. KOHEN und H.R. LINDNER (1981):

Monitoring ovarian function by a solid-phase chemiluminens-
cence immunoassay

Acta Endocrin. 101, 254-263

WHITE, H.E., F. MC CAPRA und G. F. FIELD (1963):

The structure and synthesis of firefly luciferin

J. Amer. Chem. Soc. 85, 337-341

WHITE, E.H., J.D. MIANO und M. UMBREIT (1975):

On the mechanism of firefly luciferin luminescence

J. Amer. Chem. Soc. 97, 198-200

WHITE, E.H. und D. F. ROSWELL (1970):

The chemiluminescence of organic hydrazides

Acc. Chem. Res. 3, 54-62

WHITEHEAD, T.P., L.J. KRICKA, T.J.N. CARTER und H.G.

THORPE (1979):

Analytical luminescence: Its potential in the clinical
laboratory

Clin. Chem. 25, 1531-1546

WHITEHEAD, T.P., G.H.G. THORPE, T.J.N. CARTER, C. GROUCUTT
und L.J. KRICKA (1983):

Enhanced luminescence procedure for sensitive determination
of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay

Nature 305, 158-159

WILLIAMS, D.C., G.F. HUFF und W.R. SEITZ (1976):

Evaluation of peroxyoxalate chemiluminescence for deter-
mination of enzyme generated peroxide

Anal. Chem. 48, 1003-1006

WILSON, M.B. und P.K. NAKANE (1978):

Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies
in: KNAPP, W. et al.: Immunofluorescence and related staining techniques, p. 215-223
Elsevier/North Holland Biomedical Press

WOOD, W.G. (1984):

Persönliche Mitteilung

WOOD, W.G., H. FRICKE, L. VON KLITZING, C.J. STRASBURGER und P.C. SCRIBA (1982):

Solid phase antigen luminescent immunoassays (SPALT) for the determination of insulin, insulin antibodies and gentamicin levels in human serum

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 825-831

WOOD, W.G., H. FRICKE, J. HARITZ, A. GADOW, H.-S. KRAUSZ, B. TODE, C.J. STRASBURGER und P.C. SCRIBA (1984):

An evaluation of four different luminescence immunoassay systems: CELIA (chemiluminescent immunoassay), SPALT (solid-phase antigen luminescence technique), ILMA (immunoluminometric assay) and ILSA (immunoluminometric labelled second antibody). A critical study of macro solid phases for use in immunoassay systems, part III

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 349-356

WOOD, W.G. und A. GADOW (1983):

Immobilisation of antibodies and antigens on macro solid phases - a comparison between adsorptive and covalent binding. A critical study of macro solid phases for use in immunoassay systems, part I

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 789-797

YALOW, R.S. und S.A. BERSON (1969):

Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods

Nature 184, 1648-1649

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.-P. Scheuber danke ich für wertvolle Hinweise zur IgG-Gewinnung.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau M. Büttner, die bei der Durchführung der praktischen Arbeiten half, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Herrn Lohr danke ich für das Schreiben dieser Arbeit.

Lebenslauf

Martin Lohneis	geb. am 28. August 1954 in Bamberg
Eltern	Andreas Lohneis und Agnes Lohneis geb. Popp
1960-1966	Besuch der Volksschule Steinfeld
1966-1975	Besuch des Kaiser-Heinrich-Gymna- siums in Bamberg
1975	Reifezeugnis
1975-1980	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1981	12. Februar Approbation als Tierarzt seit 16.4.1981 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygie- ne und Technologie der Milch der Universität München

